

ALEJANDRO BOËCHAT FERNANDES

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES *IL-18* E *IL-12B* EM AMOSTRA DE
PACIENTES COM *DIABETES MELLITUS* TIPO 1

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza

CURITIBA
2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Fernandes, Alejandro Boëchat

Análise de polimorfismos dos genes IL-18 e IL-12B em amostra de
pacientes com *Diabetes mellitus* tipo 1. / Alejandro Boëchat Fernandes. –
Curitiba, 2014.

160f.: il. ; 30cm.

Orientador: Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Diabetes. 2. Polimorfismo (Genética) . I. Título II. Souza, Ricardo
Lehtonen Rodrigues de. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 575.1

PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **ALEJANDRO BOËCHAT FERNANDES**, para obtenção do título de Doutor em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "B".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

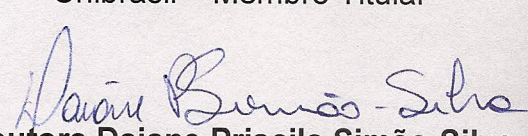
Curitiba, 18 de dezembro de 2014



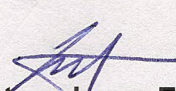
Doutor Atila Fernando Visinoni
Universidade Positivo – Membro Titular



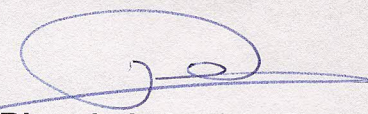
Doutora Liya Regina Mikami
Unibrasil – Membro Titular



Doutora Daiane Priscila Simão-Silva
PUC/PR – Membro Titular

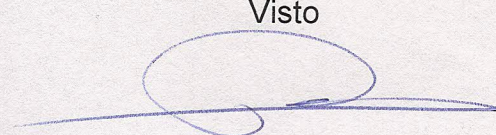


Doutora Lupe Furtado Alle
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular



Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Universidade Federal do Paraná – Orientador e Presidente da Banca

Visto



Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Prof^o Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do PPG - GEN - UFPR
Matrícula 176702

Dedico esse trabalho ao meu Pai, José Manoel Fernandes, que sempre me apoiou em tudo e me instiga a voar o mais alto possível, a minha mãe Marcia Helena Boëchat Alves Fernandes, com sua aura jovial, alegre e otimista me acalentando e me fazendo acreditar que tudo é possível, na hora certa, e a minha amada Rafaella Nogaroli, que com admiração, compreensão e elegância me retribuiu o orgulho que mutuamente sentimos na nossa procura pela excelência nas nossas vocações.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, pelo acompanhamento e orientação desde os tempos de Iniciação Científica, pela sua pessoa ímpar e amizade.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Lupe Furtado Alle, que com seu vasto conhecimento e minuciosidade, contribui substancialmente aos trabalhos realizados em parceria.

Ao Colegiado, formado por excelentes profissionais e professores, sempre prontos para compartilhar dos conhecimentos e sabedorias, proporcionaram uma formação acadêmica de altíssima qualidade humana.

“...Viver, eh oh, e não ter a vergonha de ser feliz,
Cantar e cantar e cantar,
A beleza de ser um eterno aprendiz,
Eu sei, que a vida devia ser bem melhor e será,
Mas isso não impede que eu repita:
É bonita, é bonita e é bonita...”

O que é o que é? – Gonzaginha

RESUMO

Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma questão de saúde dos dias modernos. Diabetes foi diagnosticada significativamente mais cedo (16 anos) em pacientes com pelo menos três alelos menores (*IL-18* g.-137C / g.-607A / *IL-12B* g.*159C), do que naqueles sem esses alelos (25 anos) em uma população croata. O objetivo deste estudo foi investigar a relação de dois SNPs no gene *IL-18* (rs187238, g.-137G>C; rs1946518, g.-607C>A) e um SNP do gene *IL-12B* (rs3212227 g.*159A>C, 3'UTR) com a idade de aparecimento do DM1. Um total de 1.244 pacientes com DM1 foram genotipados para esses SNPs. Os resultados mostraram que as frequências alélicas e genótípicas, bem como a mediana da idade de aparecimento do DM1 destacam a heterogeneidade apresentada pelas amostras coletadas nos 13 centros. A mediana da idade no momento do diagnóstico de DM1, foi comparada com cada um dos genótipos dos genes *IL-18* e *IL-12B* dentro de cada centro, e mostrou uma diferença significativa no centro de Bauru, para os genótipos do SNP g.-137G>C enquanto há uma tendência a significância para o centro do HC-RS quando focada no SNP g.-607C>A. Quando foram feitas comparações com a combinação de genótipos, os centros de Bauru, Ceará e Cedeba mostraram uma tendência a ser estatisticamente significativa. Em conclusão, não foi possível unir as amostras de diferentes centros em uma única amostra representativa, devido às diferenças entre eles; alguns centros, mas não todos, demonstraram que, ou apresentam diferença significativa ou uma tendência para ser significativa quando analisados os SNPs do gene *IL-18*, indicando associação com a idade de diagnóstico da doença.

Palavras-chave: *diabetes mellitus* tipo 1; *IL-18*; *IL-12B*, análises de polimorfismo

ABSTRACT

Type 1 *diabetes mellitus* (T1DM) is a health issue of modern days. Diabetes was diagnosed significantly earlier (16 years) in patients with at least three minor alleles (*IL-18* g.-137C / g.-607A / *IL-12B* g.*159C) compared with those without such alleles (25 years) in a Croatian population. The objective of this study was to investigate the relationship of two SNPs in the *IL-18* gene (rs187238, g.-137G>C; rs1946518, g.-607C>A) and one SNP of the *IL-12B* gene (rs3212227 g.*159A>C, 3'UTR) with the age of onset for DM1. A total of 1244 patients with type 1 diabetes were genotyped for these SNPs. The results showed that the allele and genotype frequencies and the median age of onset of DM1 highlight the heterogeneity of the samples collected in 13 centers. The median age at diagnosis for DM1, was compared with each of the genotypes of *IL-18* and *IL-12B* gene within each center, and showed a significant difference for the center of Bauru, for the genotypes of the SNP G.-137G>C, while there is a tendency to significance for the center of HC-RS when focused on SNP g.-607C>A. When comparisons were made using the combination of genotypes, the centers of Bauru, Ceará and Cedeiba showed a tendency to be statistically significant. In conclusion, it was not possible to merge the samples from different centers in a single representative sample due to differences between them; some centers, but not all, showed either significant differences or a tendency to be significant when SNPs in the *IL-18* gene were analyzed, indicating a correlation with the age of diagnosis for the disease.

Keywords: type 1 *diabetes mellitus*; *IL-18*; *IL-12B*, polymorphism analyses

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>IL-12B</i> NO CROMOSSOMO 5.....	58
FIGURA 2 -	LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>IL-18</i> NO CROMOSSOMO 11.....	59
FIGURA 3 -	DISPOSIÇÃO CARTOGRÁFICA DOS 13 CENTROS DE COLETA DAS AMOSTRAS.....	61
FIGURA 4 -	ESTRATÉGIA DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA UTILIZANDO SONDAS MARCADAS COM FLUORESCÊNCIA.....	64
FIGURA 5 -	EXEMPLO DE LEITURA DOS RESULTADOS DE GENOTIPAGEM COM TAQMAN.....	65
FIGURA 6 -	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (À ESQUERDA) E GENOTÍPICA (À DIREITA) DO SNP G.-137G>C DO GENE <i>IL-18</i> NOS DIFERENTES CENTROS DE COLETA.....	72
FIGURA 7 -	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (À ESQUERDA) E GENOTÍPICA (À DIREITA) DO SNP g.-607C>A DO GENE <i>IL-18</i> NOS DIFERENTES CENTROS DE COLETA.....	72
FIGURA 8 -	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (À ESQUERDA) E GENOTÍPICA (À DIREITA) DO SNP G.*159A>C DO GENE <i>IL-12B</i> NOS DIFERENTES CENTROS DE COLETA.....	72
FIGURA 9 -	DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE OS CENTROS (EIXO Z), UTILIZANDO OS DADOS DOS TRÊS SNPS, SENDO QUE OS EIXOS X E Y CORRESPONDEM ÀS COORDENADAS GEOGRÁFICAS.....	75
FIGURA 10 -	DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE OS CENTROS (EIXO Z), UTILIZANDO OS DADOS DOS 2 SNPS DO GENE <i>IL-18</i> , SENDO QUE OS EIXOS X E Y CORRESPONDEM ÀS COORDENADAS GEOGRÁFICAS.....	76
FIGURA 11 -	DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE OS CENTROS (EIXO Z), UTILIZANDO OS DADOS DO SNPS DO GENE <i>IL-12B</i> , SENDO QUE OS EIXOS X E Y CORRESPONDEM ÀS COORDENADAS GEOGRÁFICAS.....	77
FIGURA 12 -	PADRÃO OBSERVADO DE DISTRIBUIÇÃO DAS	

	IDADES DE DIAGNÓSTICO NOS CENTROS (HISTOGRAMA) E A DISTRIBUIÇÃO ESPERADA, CASO FOSSE UMA DISTRIBUIÇÃO NORMAL (LINHA AZUL).....	79
FIGURA 13 -	DISTRIBUIÇÃO DAS IDADES ATUAIS DOS PACIENTES EM MESES POR CENTRO.....	81
FIGURA 14 -	DADOS DA IDADE (EM ANOS) DE DIAGNÓSTICO DE DM1 DOS PACIENTES EM CADA CENTRO DE COLETA.....	81
FIGURA 15 -	IDADE DE DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM DM1 DOS CENTROS NA AMOSTRA ESTRATIFICADA PELOS GENÓTIPOS DOS SNPS G.-137G>C E G.-607C>A DO GENE <i>IL-18</i> E G.*159A>C DO GENE <i>IL-12B</i>	83-84
FIGURA 16 -	BOXPLOT COMPARANDO A IDADE DE DIAGNÓSTICO DE DM1 COM GRUPOS DE GENÓTIPOS COMPOSTOS PELOS SNPS G.-137G>C E G.-607C>A DO GENE <i>IL-18</i> E G.*159A>C DO GENE <i>IL-12B</i> NOS DIFERENTES CENTROS.....	87-88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	OUTROS TIPOS ESPECÍFICOS DE <i>DIABETES MELLITUS</i> (DM).25
TABELA 2 -	LOC/E MARCADORES ASSOCIADOS AO DM1, AGRUPADOS POR CROMOSSOMO.....30-39
TABELA 3 -	NÚMERO DE AMOSTRAS DE PACIENTES COM DM1 POR CENTRO.....60
TABELA 4 -	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS SNPS G.-137G>C E G.-607C>A DO GENE <i>IL-18</i> E DO G.*159A>C DO GENE <i>IL-12B</i> NAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM DM1 POR CENTRO DE COLETA.....69-71
TABELA 5 -	TESTE EXATO DA DIFERENCIAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DE CADA CENTRO BASEADAS EM FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS.....74
TABELA 6 -	ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS IDADES DE DIAGNÓSTICO EM CADA CENTRO.....79
TABELA 7 -	COMPARAÇÕES DAS MEDIANAS DE IDADES DE DIAGNÓSTICO DOS CENTROS.....80
TABELA 8 -	COMPARAÇÃO DAS MEDIANAS, ATRAVÉS DO TESTE DE MANN WHITNEY, ENTRE OS GENÓTIPOS DOS ALELOS USUAIS CONTRA OS NÃO-USUAIS.....85
TABELA 9 -	ANÁLISE DOS GRUPOS DE GENÓTIPOS COMPOSTOS PELOS SNPS G.-137G>C E G.-607C>A DO GENE <i>IL-18</i> E G.*159A>C DO GENE <i>IL-12B</i> , CITADAS NOS GRÁFICOS DA FIGURA 16, EXPLICITANDO AQUELES QUE DEMONSTRAM UMA TENDÊNCIA A APRESENTAR DIFERENÇA SIGNIFICATIVA QUANDO OBSERVADA A MEDIANA DA IDADE DE DIAGNÓSTICO.....86
TABELA 10 -	COMPARAÇÃO DAS MEDIANAS ATRAVÉS DO TESTE DE MANN WHITNEY DOS GRUPOS DE GENÓTIPOS, USANDO-SE OS GENÓTIPOS DOS SNPS G.-137G>C (GG E GC) E G.-607C>A (CC) DO GENE <i>IL-18</i> CONTRA O RESTO, BASEANDO EM UMA TENDÊNCIA

TABELA 11 -	DE PADRÃO RECORRENTE ENTRE CENTROS.....	89
	COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E	
	GENOTÍPICAS DOS SNPS G.-137G>C E G.-607C>A DO	
	GENE IL-18 E DO G.*159A>C DO GENE IL-12B NAS	
	AMOSTRAS DE PACIENTES COM DM1 DOS 13	
	CENTROS DE COLETA COM DADOS DE AMOSTRAS DE	
	INDIVÍDUOS COM ANCESTRALIDADE EUROPEIA (CEU);	
	DADOS DE AMOSTRAS DO TRABALHO DE HADŽIJA ET.	
	AL. (2013); E DO TRABALHO DE TAVARES	
	ET. AL. (2013).....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP:	trifosfato de adenosina
BB:	ratos Bio-Breeding
DM:	<i>diabetes mellitus</i>
DM1:	<i>diabetes mellitus</i> do tipo 1
DM1A:	<i>diabetes mellitus</i> do tipo 1 autoimune
DM2:	<i>diabetes mellitus</i> do tipo 2
DL:	desequilíbrio de ligação
GWAS:	estudos de associação do genoma;
HLA:	antígeno leucocitário humana
HDL:	lipoproteína de alta densidade
HMG-box:	High Mobility Group box
ICA:	anticorpos celulares da ilhota
Lada:	diabetes latente autoimune do adulto
LDL:	lipoproteína de baixa densidade
MHC:	complexo principal de histocompatibilidade
MICA:	classe I de cadeia relacionada do tipo A
MODY:	diabetes familiar com idade de diagnóstico precoce
NAD:	neuropatia autonômica diabética
NOD:	ratos diabéticos não obesos
NK:	Natural killer
OR:	Odds ratio
Pb:	pares de bases
PCR:	reação em cadeia da polimerase
PC:	peptídeo C
SNP:	polimorfismos de nucleotídeo único
TDT:	teste de desequilíbrio de ligação
Treg:	células T reguladoras
T1DGC:	consórcio de genética de diabetes do tipo 1

LISTA DE SÍMBOLOS

@ -	Arroba
μL -	Microlitro
ng -	Nanograma
α -	Alfa
β -	Beta

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Revisão Bibliográfica	19
2.1. <i>Diabetes mellitus</i>	19
2.2. Classificação de Diabetes	22
2.2.1. <i>Diabetes mellitus</i> do tipo 1	27
2.2.2. Genética do DM1	28
2.2.2.1. Genes do MHC	40
2.2.2.2. Genes fora da região do MHC	46
2.2.2.3. Os Dois Genes Candidatos escolhidos para o presente estudo	55
2.2.2.3.1. <i>IL-12B</i>	58
2.2.2.3.1. <i>IL-18</i>	59
3. Material e Métodos	60
3.1 Material	60
3.1.1 Amostra de DM1	60
3.2 Métodos	61
3.2.1 Extração de DNA	61
3.2.3 PCR	62
3.2.3.1 Genotipagem de SNPs	62
3.2.4 Análises dos dados	65
3.2.4.1 Frequências alélicas e genotípicas	65
3.2.4.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação, inferência haplotípica e teste de diferenciação.	66
4. Resultados	67
4.1 Análises das frequências dos SNPs dos genes <i>IL-18</i> e <i>IL-12B</i> em pacientes com DM1 em diferentes regiões do Brasil.	67
4.2 Diferenciação das amostras entre os centros	73
4.3 Genes <i>IL-18</i> e <i>IL-12B</i> e idade de diagnóstico do DM1.	82
5. Discussão	90
5.1 Análises das frequências dos SNPs dos genes <i>IL-18</i> e <i>IL-12B</i> em pacientes com DM1 em diferentes regiões do Brasil.	90
5.2 Diferenciação das amostras entre os centros	94
5.3 Genes <i>IL-18</i> e <i>IL-12B</i> e idade de diagnóstico do DM1.	95
6. Conclusões	97
Referências	98
Apêndices	134

1. Introdução

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina em exercer adequadamente sua função. A hiperglicemia crônica é frequentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial, disfunção endotelial e obesidade (SOC. BRAS. DIABETES, 2014).

O DM do tipo 1 (DM1) resulta primariamente da destruição das células beta das ilhotas pancreáticas, produtoras de insulina, e tem tendência à cetoacidose. Inclui casos decorrentes de doença autoimune e casos de causa desconhecida. A doença corresponde a 5 a 10 % do total de casos de diabetes. A forma de progressão rápida é comumente observada em crianças e adolescentes, mas pode ocorrer em adultos. A forma de progressão lenta ocorre geralmente em adultos e é denominada de diabetes latente autoimune do adulto (Lada).

Com diversas funções na resposta imune, em particular com fortes efeitos na determinação da natureza da resposta imune que está sendo montada, a interleucina 12 (IL-12) influencia células T ativadas a secretar citocinas típicas da resposta imune inflamatória, enquanto que a interleucina 23 (IL-23) de recrutamento médio está envolvida na ativação de células necessárias para a indução da inflamação crônica.

Devido a essas propriedades das citocinas o gene interleucina 12 subunidade beta (*IL-12B*) é um candidato para a participação na resposta autoimune desregulada, que por sua vez predispõe para o aparecimento do DM1. Vários estudos, que investigaram amostras de famílias caucasoides americanas (Davoodi-Semiromi *et al.*, 2002), amostras ocidentais australianas (Windsor *et al.*, 2004), indivíduos japoneses (Yang *et al.*, 2006), implicaram *IL-12B* na susceptibilidade ao DM1.

Entre várias citocinas, a interleucina-18 (IL-18) é uma citocina única que aumenta a resposta imune derivada tanto do Th1 quanto do Th2 (Linfócitos T auxiliares) (NAKANISHI *et al.*, 2001). IL-18 contribui para a patogênese de DM1 agindo como uma citocina pro-inflamatória, e em sinergia com a interleucina 12

(IL-12), promove o desenvolvimento da resposta dos linfócitos Th1 por indução da produção de Gama-interferon (IFN- γ), modulando atividade das células NK, aumento de TNF-alfa (TNF- α) e produção de IL-1 pelos macrófagos, regula o aumento da expressão de moléculas de aderência, e induz a produção de óxido nítrico na área da inflamação crônica. (MCINNES *et al.*, 2000; NAKAHIRA *et al.*, 2002). O aumento de IL-18 precede a fase aguda de desenvolvimento de doenças autoimunes como o diabetes (ROTHER *et al.*, 1997).

Um estudo croata mostrou que a combinação específica de alelos (IL-18 g.-137C/ g.-607A /IL-12B G.*159C) está associada com um maior risco de desenvolvimento da doença em idades mais precoces (16 anos em contraste com 25 anos) e pode estar relacionada a uma pior efetividade no controle glicêmico quando apresenta genótipos IL-18 g.-137CC/g.-607AA/ IL-12AA (Hadžija *et al.*, 2013).

Na maioria das doenças complexas, incluindo o *Diabetes mellitus*, há uma parcela causal ambiental, e outra parcela genética. O melhor entendimento do mecanismo genético que predispõe à doença é de grande valia.

Os genes pesquisados no presente estudo, sendo eles os genes *IL-12B* e *IL-18*, já foram associados com diabetes em várias outras populações e seu estudo em uma grande amostra de população brasileira ajudará a entender sua participação nessa doença, uma vez que os dados da literatura demonstraram resultados contrastantes em diferentes populações. Os resultados contribuirão para o entendimento da doença tanto no contexto regional como mundial.

O objetivo geral deste estudo é verificar a existência de associação entre DM1 e os genes *IL-18* e *IL-12B* relacionados com idade de diagnóstico da doença em uma amostra proveniente de 13 centros diferentes no Brasil.

Os objetivos específicos são:

1. Analisar as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs g.-137G>C (rs187238) e g.-607C>A (rs1946518) do gene *IL-18* e g.*159A>C (rs3212227) do gene *IL-12B* em pacientes com DM1 de diferentes centros de coleta.

2. Analisar a relação dos SNPs dos genes *IL-12B* e *IL-18* com a idade do diagnóstico do DM1.
3. Comparar os resultados obtidos com os estudos realizados em outras populações.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. *Diabetes mellitus*

O *Diabetes mellitus* (DM) não é uma única doença única, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, a qual é o resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambas. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica, frequentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial, disfunção endotelial e obesidade (SOC. BRAS. DIABETES, 2014).

Complicações microvasculares, comprometendo o sistema nervoso periférico e autônomo são comuns no DM. Os pacientes são mais propensos a distúrbios termo regulatórios, como hipertermia e hipotermia, e à desidratação (CHISHOLM, *et al.* 1998).

Além disso, a neuropatia autonômica diabética (NAD) é uma complicação comum e suas principais manifestações clínicas incluem taquicardia de repouso, hipotensão ortostática, constipação, intolerância ao exercício e disfunção sudorípara. Tais sintomas são resultados de uma disfunção no sistema nervoso autônomo, tanto parassimpático quanto simpático (VINIKET *et al.*, 2003).

A DM1 é uma doença multifatorial, causada por fatores ambientais e genéticos. O número total de regiões associadas até o ano 2014 está em 47 (www.T1DBase.org).

Uma evidência da influência de fatores ambientais é o aumento global de casos de diabetes, verificado pela incidência de 3% por ano, por fatores nutricionais que influenciam na susceptibilidade para DM, como por exemplo, a exposição precoce ao leite de vaca e glúten (DAHL-JORGENSEN *et al.*, 1991; SAVILAHTI *et al.*, 1993; VAARALA *et al.*, 2006).

Os fatores ambientais podem ser agrupados em fatores de susceptibilidade introduzidos no ambiente (infecção viral, dieta, exposição a nitratos), e fatores de proteção removidos do ambiente (hipótese higiênica, deficiência de vitamina D) (MERRIMAN *et al.*, 2009).

De acordo com a "hipótese higiênica", a diminuição de infecções no mundo contemporâneo está na origem do aumento da incidência de ambas as doenças autoimunes e alérgicas. A hipótese da higiene é baseada em dados epidemiológicos, particularmente em estudos de migração, mostrando que os indivíduos que migram para países com baixa incidência em doenças autoimunes para países que apresentam alta incidência dessas, adquirem os distúrbios imunológicos, com uma alta incidência na primeira geração (Okada *et al.*, 2010).

Mudanças no estilo de vida em países industrializados têm levado a uma diminuição do fardo recorrente das doenças infecciosas que costumam estar presentes na vida rural e estão associados com o aumento de doenças alérgicas e autoimunes. A "hipótese higiênica" foi proposta pela primeira vez por Strachan (1989), que observou uma correlação inversa entre a rinite e o número de irmãos mais velhos quando foi observado um grupo de mais de 17.000 crianças britânicas nascidas em 1958 (Strachan, 1989). Foi proposto por Okada (2010) que é possível prolongar a hipótese do domínio da alergia, onde foi formulado, incluindo as doenças autoimunes, tais como o *diabetes mellitus* do tipo 1 (DM1) ou a esclerose múltipla (MS) (Bach, 2002). A ideia principal é que alguns agentes infecciosos - notadamente aquelas que co-evoluíram com os seres humanos - são capazes de proteger o nosso organismo contra um espectro grande de desordens autoimunes.(Okada *et al.*, 2010).

A velocidade de progressão do DM1 é um processo que pode ser variável, evoluindo com a perda da capacidade de secreção insulínica em alguns meses ou até em vários anos. Além da destruição das células β do pâncreas, pode haver comprometimento da função secretora das células remanescentes, de maneira transitória ou permanente (SCREENAN *et al.*, 1998; MARCHETTI *et al.*, 2000).

Apenas seis *loci* gênicos eram comumente aceitos como associados com *Diabetes mellitus* do tipo I (DM1): a região do antígeno leucocitário humano (HLA) de classe II; insulina (*INS*); proteína não receptora-tipo22 tirosina fosfatase pirosina (*PTPN22*); interleucina 2 (IL2) receptora alfa (IL2RA),

antígeno citotóxico T-linfocitoassociado (*CTLA4*) e interferon induzido por helicase C de domínio 1 (*IFIH1*) (www.T1DBase.org).

2.2. Classificação de Diabetes

A longo prazo, o DM provoca alterações que levam à disfunção, dano ou falência de vários órgãos, incluindo nefropatia, com possível evolução para insuficiência renal, retinopatia, artropatia de Charcot e disfunções autonômicas, inclusive disfunção sexual. A classificação atualmente recomendada utiliza os estágios clínicos do DM, desde a normalidade, passando por tolerância à glicose diminuída e/ou glicemia em jejum alterada, até o DM propriamente dito (SOC. BRAS. DIABETES, 2014).

A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Alberti and Zimmet, 1998), pela Associação Americana de Diabetes (ADA) (Diagnosis and classification of *diabetes mellitus*, 2013) e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SOC. BRAS. DIABETES, 2014), inclui quatro classes clínicas:

DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional. Ainda há duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (DCVs).

A classificação atual do DM (SOC. BRAS. DIABETES, 2014) baseia-se na etiologia e não no tipo de tratamento, portanto, os termos DM insulino-dependente (IDDM) e DM insulino-independente (IIDM) devem ser eliminados dessa categoria classificatória, sendo sugeridos os seguintes critérios:

O DM do tipo 1 (DM1) resulta primariamente da destruição das células beta das ilhotas pancreáticas, produtoras de insulina, e tem tendência à cetoacidose. Inclui casos decorrentes de doença autoimune e casos de causa desconhecida, este último são casos em que não há evidências de processo autoimune, sendo, portanto, referidos como forma idiopática de DM1. Corresponde de 5 a 10 % do total de casos de diabetes. Os marcadores de autoimunidade são os autoanticorpos anti-insulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD 65), antitirosina-fosfatases (IA2 e IA2B) e antitransportador de zinco (Znt) (Palmer *et al.*, 1983; Baekkeskov *et al.*, 1990; Rabin *et al.*, 1994; Gorus *et al.*, 1997).

Esses anticorpos podem estar presentes meses ou anos antes do diagnóstico clínico, ou seja, na fase pré-clínica da doença, e em até 90% dos indivíduos quando se detecta hiperglicemia. Além do componente autoimune, o DM1 apresenta forte associação a determinados genes do sistema antígeno leucocitário humano (HLA), alelos que podem suscitar o desenvolvimento da doença ou proteger contra ela (Todd *et al.*, 1987; Erlich *et al.*, 2008).

A taxa de destruição das células beta é variável, sendo, em geral, mais rápida entre as crianças. A forma lentamente progressiva ocorre em adultos, sendo referida como diabetes autoimune latente do adulto (LADA) (SOC. BRAS. DIABETES, 2014).

Ao contrário das formas mais comuns, o DM1 idiopático corresponde à minoria dos casos e caracteriza-se pela ausência de marcadores de autoimunidade contra as células beta e não associação a haplótipos do sistema HLA. Os indivíduos com essa forma de DM podem desenvolver cetoacidose e apresentam graus variáveis de deficiência de insulina (SOC. BRAS. DIABETES, 2014).

Como a avaliação dos auto-anticorpos não se encontra disponível em todos os centros de saúde, a classificação etiológica do DM1 nas subcategorias autoimune e idiopática pode não ser sempre possível (SOC. BRAS. DIABETES, 2014).

O DM do tipo 2 (DM2) é a forma presente em 90% a 95% dos casos e caracteriza-se por defeitos na ação e secreção da insulina. Em geral, ambos os defeitos estão presentes quando a hiperglicemia se manifesta, porém pode haver predomínio de um deles. A maioria dos pacientes com essa forma de DM apresenta sobrepeso ou obesidade, e cetoacidose raramente se desenvolve de modo espontâneo, ocorrendo apenas quando se associa a outras condições como infecções. O DM2 pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticado após os 40 anos. Os pacientes não dependem de insulina exógena para sobreviver, porém podem necessitar de tratamento com insulina para obter controle metabólico adequado (SOC. BRAS. DIABETES, 2014).

Diferentemente do DM1 autoimune, não há indicadores específicos para o DM2. Há, provavelmente, diferentes mecanismos que resultam nessa forma de DM, e com a identificação futura de processos patogênicos específicos ou

defeitos genéticos, o número de pessoas com essa forma de DM irá diminuir às custas de mudanças para uma classificação mais definitiva em outros tipos específicos de DM (SOC. BRAS. DIABETES, 2014).

Outros tipos específicos de DM (Tabela 1) são as formas menos comuns cujos defeitos ou processos causadores podem ser identificados. A apresentação clínica desse grupo é bastante variada e depende da alteração de base. Estão incluídos nessa categoria defeitos genéticos na função das células beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino e outras condições (SOC. BRAS. DIABETES, 2014).

TABELA 1 - OUTROS TIPOS ESPECÍFICOS DE *DIABETES MELLITUS* (DM)

DEFEITOS GENÉTICOS NA FUNÇÃO DAS CÉLULAS BETA MODY 1 (defeitos no gene HNF4A) MODY 2 (defeitos no gene GCK) MODY 3 (defeitos no gene HNF1A) MODY 4 (defeitos no gene IPF1) MODY 5 (defeitos no gene HNF1B) MODY 6 (defeitos no gene NEUROD1) Diabetes Neonatal Transitório Diabetes Neonatal Permanente DM mitocondrial Outros	INDUZIDO POR MEDICAMENTOS OU AGENTES QUÍMICOS Determinadas toxinas Pentamidina Ácido nicotínico Glicocorticoides Hormônio tireoidiano Diazóxido Agonistas beta-adrenérgicos Tiazídicos Interferon Outros	DEFEITOS GENÉTICOS NA AÇÃO DA INSULINA Resistência à insulina do tipo A Leprechaunismo Síndrome de Rabson-Mendenhall DM lipoatrófico Outros
OUTRAS SÍNDROMES GENÉTICAS POR VEZES ASSOCIADAS A DM Síndrome de Down Síndrome de Klinefelter Síndrome de Turner Síndrome de Wolfram Ataxia de Friedreich Coreia de Huntington Síndrome de Laurence-Moon-Biedl Distrofia miotônica Síndrome de Prader-Willi Outros	DOENÇAS DO PÂNCREAS EXÓCRINO Pancreatite Pancreatectomia ou trauma Neoplasia Fibrose cística Pancreatopatiafibrocalculosa Outros	FORMAS INCOMUNS DE DM AUTOIMUNE Síndrome de Stiff-Man Anticorpos antirreceptores de insulina Outros
	INFECÇÕES Rubéola congênita Citomegalovírus Outros	ENDOCRINOPATIAS Acromegalia Síndrome de Cushing Endocrinopatias Glucagonoma Feocromocitoma Somatostinoma Aldosteronoma Outros

FONTE: SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (2014)

Nota: MODY: Maturity onset diabetes of the Young

DM Gestacional trata-se de qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação. Entretanto, aquelas pacientes de alto risco e que na consulta inicial de pré-natal já preenchem os critérios para diabetes fora da gestação serão classificadas não como diabetes gestacional mas como *diabetes mellitus*. Similar ao DM2, o DM gestacional associa-se tanto à resistência à insulina quanto à diminuição da função das células beta (Buchanan *et al.*, 1990; Kuhl, 1991; Kautzky-Willer *et al.*, 1997).

O DM gestacional ocorre em 1% a 14% de todas as gestações, dependendo da população estudada, e relaciona-se com aumento de morbidade e mortalidade perinatais (Dornhorst *et al.*, 1992; Lawrence *et al.*, 2008). No Brasil, cerca de 7% das gestações são complicadas pela hiperglicemia gestacional (Schmidt *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2001).

Deve-se reavaliar pacientes com DM gestacional 4 a 6 semanas após o parto e reclassificá-las como apresentando DM, glicemia de jejum alterada, tolerância à glicose diminuída ou normoglicemia. Na maioria dos casos, há reversão para a tolerância normal após a gravidez, porém há 10% a 63% de risco de desenvolver DM2 dentro de cinco a 16 anos após o parto (Henry and Beischer, 1991; Kim *et al.*, 2002; Jarvela *et al.*, 2006).

Classes intermediárias no grau de tolerância à glicose referem-se a estados intermediários entre a homeostase normal da glicose e o DM. A categoria glicemia de jejum alterada refere-se às concentrações de glicemia de jejum inferiores ao critério diagnóstico para DM, porém mais elevadas que o valor de referência normal (SOC. BRAS. DIABETES, 2014).

A tolerância à glicose diminuída representa uma anormalidade na regulação da glicose no estado pós-sobrecarga, diagnosticada por meio de teste oral de tolerância à glicose (TOTG), o qual inclui a determinação da glicemia de jejum e de 2 horas após a sobrecarga com 75 g de glicose. A glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída são categorias de risco aumentado para o desenvolvimento do DM e o termo pré-diabetes também é utilizado para designar essas condições (SOC. BRAS. DIABETES, 2014).

2.2.1. *Diabetes mellitus* do tipo 1

O diabetes do tipo 1 Autoimune (diabetes do tipo 1A) é uma doença autoimune endócrino órgão-específico, que é causada pela destruição imunológica das células β pancreáticas (ZHANG *et al.*, 2008). Anticorpos para antígenos relacionados à ilhota, incluindo anticorpos descarboxilase do ácido glutâmico (GADAs) e anticorpos para antígeno insulino relacionados 2 (AI-2) são marcadores de autoimunidade para células das ilhotas (LESLIE *et al.*, 1999; BARKE *et al.*, 2006.). Quando estes anticorpos são positivos, o diabetes do paciente é geralmente considerado como sendo o tipo 1, mesmo se eles não são dependentes de insulina (GROOP *et al.*, 1986; TUOMI *et al.*, 1993; KAHN *et al.*, 1997).

Anticorpos para antígenos relacionados à ilhota estão presentes antes do aparecimento do diabetes do tipo 1 (DM1) (TARN *et al.*, 1988), e seu valor preditivo para o desenvolvimento do DM1 tem sido repetidamente investigado em parentes próximos de pacientes com DM1 e na população em geral (TARN *et al.*, 1988; BRUINING *et al.*, 1989; BARKER *et al.*, 2004; SOSENKO *et al.*, 2008; LAGASSE *et al.*, 2010; BINGLEY *et al.*, 2010).

Uma das principais limitações dos estudos em pacientes com DM1 é a dificuldade de se mensurar a massa de células β *in vivo*, sendo necessário a utilização de métodos indiretos para avaliação dessa massa e da função pancreática. Esses métodos indiretos foram sucessivamente corroborados quando o nível da capacidade de secreção de insulina mostrou ter correlação aproximada com a massa de células β em pacientes que tiveram transplante das ilhotas pancreáticas (TSAI *et al.*, 2006).

A avaliação da função das células β pode ser feita por diferentes métodos. A forma mais direta é a medição da secreção endógena de insulina. Uma das limitações é a variação (40 - 60 %) dos níveis de insulina no sangue periférico avaliação precisa da insulina. Além da dificuldade de diferenciar a insulina da pró-insulina e pró-insulina intermediárias, como também a insulina exógena da endógena (PALMER *et al.*, 2004).

A forma mais eficiente, validada clinicamente, para mensurar a secreção endógena de insulina é através da quantificação do peptídeo C. O peptídeo C é cossecretada juntamente com a insulina, em concentrações equimolares, como sub produto da clivagem enzimática da pró-insulina para insulina. Não sofre extração hepática, e sofre filtração e retirada do plasma somente via renal de forma constante, indiferentemente das concentrações plasmáticas e níveis de glicose no sangue (PALMER *et al.*, 2004; VERDRAME *et al.*, 2004; TSAI *et al.*, 2006).

DM1 clínico representa o último estágio de insulite, e já foi estimado que no tempo de diagnóstico, somente 10 a 20% das células β estão em funcionamento (KNIP *et al.*, 2008).

Doença de Graves, que também é uma doença autoimune endócrina órgão-específico, é frequentemente associada com DM1 (EISENBARTH, G.S. *et al.*, 2004). Nestes pacientes, os níveis de GADA tendem a ser elevados (KAWASAKI, E. *et al.*, 1994), o que pode indicar poderosa capacidade de produção de processo autoimune para antígenos da ilhota. Por outro lado, GADA às vezes é positivo em pacientes com a doença de Graves sem diabetes (KAWASAKI, E. *et al.*, 1995; HALLENGREN, B. *et al.*, 1996; MAUGENDRE *et al.*, 1997).

Nestes pacientes, anticorpos GADA podem existir independentemente da destruição das células β . No entanto, o destino de pacientes com a doença de Graves que são positivos para GADA é obscuro, e o valor preditivo do GADA para o desenvolvimento de DM1 em pacientes com Graves ainda deve ser esclarecido (TANIYAMA *et al.*, 2011).

2.2.2. Genética do DM1

Com o advento de tecnologias de genotipagem de alta eficácia, tem havido uma explosão de estudos GWAS, levando a identificação de *loci* adicionais de susceptibilidade ao DM1 (SMYTH *et al.*, 2006; TODD *et al.*, 2007, A WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM, ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO AMPLA DE GENOMA *et al.*, 2007), alguns dos quais foram replicados. (TODD *et al.*, 2007, HAKONARSON *et al.*, 2008). No primeiro

estudo GWAS publicado para diabetes (SMYTH *et al.*, 2006) foram obtidos dados convincentes para uma região de suscetibilidade no cromossomo 2q24.3 para DM1 contendo quatro genes, incluindo o gene candidato funcional *IFIH1* que é o sexto principal *locus*. *IFIH1* codifica o receptor intracelular MDA5 para RNA do picorna-vírus, um dos quais (vírus coxsackie) tem sido implicado no DM1 (HOWSON *et al.*, 2009).

Outros GWAS e testes de SNPs candidatos associados com DM1 e outras doenças autoimunes (doença celíaca e artrite reumatóide) levaram a identificação de 44 *loci* não-HLA que mostram evidências convincentes de associação com DM1; (BOTTINI *et al.*, 2004; SMYTH *et al.*, 2006; HAKONARSON *et al.*, 2007; LOWE *et al.*, 2007; TODD *et al.*, 2007; HAKONARSON *et al.*, 2008; CONCANNON *et al.*, 2008; SMYTH *et al.*, 2008; FUNG *et al.*, 2008; COOPER *et al.*, 2008; BARRETT *et al.*, 2009; QU *et al.*, 2009; BRADFIELD *et al.*, 2011; PLAGNOL *et al.*, 2011; SWAFFORD *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2012; SANDHOLM *et al.*, 2012)

O crescente ritmo das descobertas de associações genéticas com DM1 têm sido consideráveis. Devido à grande escala dos estudos de associação do genoma (GWAS), bem como estudos de genes candidatos, o número total de regiões associadas, incluindo a do MHC, em 2014 está em 47 (www.T1DBase.org; tabela 2).

TABELA 2. LOC/E MARCADORES ASSOCIADOS AO DM1, AGRUPADOS POR CROMOSSOMO.

#	Cromossomo	Região	SNP	Genes Candidatos (Total)
1	1	1p13.2	rs2476601 rs6679677	<i>AP4B1</i> , <i>BCL2L15</i> , <i>DCLRE1B</i> , <i>HIPK1</i> , , <i>MAGI3</i> , <i>OLFML3</i> , <i>PHTF1</i> , <i>PTPN22</i> , <i>RSBN1</i> , <i>SYT6</i> , <i>SLC16A1</i> , <i>LRIG2</i> , <i>TRIM33</i> (14)
2	1	1q32.1	rs3024505 rs3024493	<i>DYRK3</i> , <i>IL10</i> , <i>IL19</i> , <i>IL20</i> , <i>MAPKAPK2</i> , <i>SRGAP2</i> , <i>IKBKE</i> , <i>C1orf147</i> , <i>RASSF5</i> , <i>EIF2D</i> , <i>IL24</i> , <i>FAIM3</i> , <i>PIGR</i> , <i>FCAMR</i> , <i>C1orf116</i> , <i>YOD1</i> , <i>PFKFB2</i> , <i>C4BPB</i> , <i>C4BPA</i> , <i>CD55</i> (20)
3	2	2p23.3	rs478222	<i>CENPO</i> , <i>ADCY3</i> , <i>DNAJC27</i> , <i>EFR3B</i> , <i>POMC</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>ITSN2</i> , <i>NCOA1</i> , <i>PTRHD1</i> , <i>DTNB</i> , <i>ASXL2</i> (11)
4	2	2q11.2	rs9653442,	<i>AFF3</i> , <i>CHST10</i> , <i>LOC150577</i> , <i>LONRF2</i> , <i>REV1</i> , <i>NMS</i> , <i>PDCL3</i> , <i>NPAS2</i> (8)
5	2	2q24.2	rs1990760	<i>FAP</i> , <i>GCA</i> , <i>GCG</i> , <i>IFIH1</i> , <i>KCNH7</i> , <i>SLC4A10</i> , <i>DPP4</i> (7)
6	2	2q32.3	rs7574865	<i>STAT4</i> , <i>STAT1</i> , <i>MFSD6</i> , <i>TMEM194B</i> , <i>NAB1</i> , <i>GLS</i> , <i>MYO1B</i> (7)
7	2	2q33.2	rs3087243 rs11571316	<i>CTLA4</i> , <i>ICOS</i> , <i>CYP20A1</i> , <i>ABI2</i> , <i>RAPH1</i> , <i>CD28</i> (6)
8	3	3p21.31	rs333	<i>CCR1</i> , <i>CCR2</i> , <i>CCR3</i> , <i>CCR5</i> , <i>CCRL2</i> , <i>FYCO1</i> , <i>LRRC2</i> , <i>LTF</i> , <i>RTP3</i> , <i>TDGF1</i> , <i>XCR1</i> , <i>LUZPP1</i> , <i>LARS2</i> , <i>LIMD1</i> , <i>SACM1L</i> , <i>SLC6A20</i> , <i>LZTFL1</i> , <i>CCR9</i> , <i>CXCR6</i> , <i>ALS2CL</i> , <i>TMIE</i> , <i>PRSS50</i> , <i>PRSS46</i> , <i>PRSS45</i> , <i>PRSS42</i> , <i>MYL3</i> , <i>PTH1R</i> , <i>AC109583.1</i> (<i>ENSG00000268537</i>), <i>CCDC12</i> , <i>NBEAL2</i> , <i>SETD2</i> (32)

Nota: Em negrito os genes comprovadamente causadores.

TABELA 2. LOC/E MARCADORES ASSOCIADOS AO DM1, AGRUPADOS POR CROMOSSOMO.

#	Cromossomo	Região	SNP	continuação	
				Genes Candidatos (Total)	
9	4	4p15.2	rs10517086	<i>SLC34A2</i> , <i>SEL1L3</i> , <i>SMIM20</i> , <i>RBPJ</i> , <i>CCKAR</i> , <i>TBC1D19</i> (6)	
10	4	4q27	rs4505848	<i>ADAD1</i> , <i>IL2</i> , <i>IL21</i> , <i>KIAA1109</i> , <i>ANXA5</i> , <i>TMEM155</i> , <i>AC079341.1</i> , <i>EXOSC9</i> , <i>CCNA2</i> , <i>BBS7</i> , <i>TRPC3</i> , <i>BBS12</i> , <i>FGF2</i> , <i>NUDT6</i> , <i>SPATA5</i> (15)	
11	6	MHC	rs6916742, rs9268645	(157) (22 nos arredores)	
12	6	6q15	rs11755527 rs597325	<i>BACH2</i> , <i>ANKRD6</i> , <i>LYRM2</i> , <i>MDN1</i> , <i>GJA10</i> , <i>MAP3K7</i> (6)	
13	6	6q22.32	rs9388489	<i>CENPW</i> , , <i>HEY2</i> , <i>NCOA7</i> , <i>HINT3</i> , <i>TRMT11</i> , <i>RSPO3</i> , <i>RNF146</i> , <i>ECHDC1</i> , <i>SOGA3</i> , <i>C6orf58</i> (11)	
14	6	6q25.3	rs1738074	<i>C6orf99</i> , <i>RSPH3</i> , <i>TAGAP</i> , <i>TULP4</i> , <i>TMEM181</i> , <i>AL591025.1</i> (<i>ENSG00000214239</i>), <i>DYNLT1</i> , <i>SYTL3</i> , <i>EZR</i> , <i>FNDC1</i> (10)	
15	6	6q27	rs924043	<i>WDR27</i> , <i>C6orf120</i> , <i>PHF10</i> , <i>TCTE3</i> , <i>ERMARD</i> , <i>DLL1</i> , <i>FAM120B</i> , <i>PSMB1</i> , <i>TBP</i> , <i>PDCD2</i> (10)	
16	7	7p15.2	rs7804356	<i>C7orf71</i> , <i>HOXA1</i> , <i>HOXA2</i> , <i>HOXA3</i> , <i>HOXA4</i> , <i>HOXA5</i> , <i>HOXA6</i> , <i>HOXA7</i> , <i>HOXA9</i> , <i>SKAP2</i> , <i>NFE2L3</i> , <i>HNRNPA2B1</i> , <i>CBX3</i> , <i>SNX10</i> , <i>KIAA0087</i> , <i>RP1-170O19.20</i> (<i>ENSG00000257184</i>), <i>HOXA10</i> , <i>HOXA11</i> , <i>HOXA13</i> , <i>EVX1</i> , <i>HIBADH</i> (23)	

Nota: Em negrito os genes comprovadamente causadores.

TABELA 2. LOC/E MARCADORES ASSOCIADOS AO DM1, AGRUPADOS POR CROMOSSOMO.

					continuação
#	Cromossomo	Região	SNP	Genes Candidatos (Total)	
17	7	7p12.2	rs10272724	IKZF1 , <i>FIGNL1</i> , <i>DDC</i> , <i>GRB10</i> , <i>VWC2</i> , <i>ZPBP</i> , <i>C7orf72</i> , <i>COBL</i> (8)	
18	7	7p12.1	rs4948088	<i>COBL</i> , <i>IKZF1</i> , <i>FIGNL1</i> , <i>DDC</i> , <i>GRB10</i> (7)	
19	9	9p24.2	rs10758593, rs7020673	GLIS3 , <i>SLC1A1</i> , <i>SPATA6L</i> , <i>PPAPDC2</i> , <i>CDC37L1</i> , <i>AK3</i> , <i>RCL1</i> (8)	
20	10	10p15.1	rs11258747 rs12251307 rs7090530	IL2RA , RBM17 , PRKCQ , <i>CALML5</i> , <i>CALML3</i> , <i>ASB13</i> , <i>FAM208B</i> , <i>GDI2</i> , <i>ANKRD16</i> , <i>FBXO18</i> , <i>IL15RA</i> , <i>PFKFB3</i> , <i>DKFZP667F0711</i> , (12)	
21	10	10q23.31	rs10509540	RNLS , <i>PAPSS2</i> , <i>ATAD1</i> , <i>KLLN</i> , <i>PTEN</i> , <i>LIPJ</i> , <i>LIPF</i> , <i>LIPK</i> , <i>LIPN</i> , <i>LIPM</i> , <i>ANKRD22</i> , <i>STAMBPL1</i> , <i>ACTA2</i> (13)	
22	11	11p15.5	rs689 rs7111341 rs7928968	<i>ASCL2</i> , <i>IGF2</i> , <i>IGF2AS</i> , INS , <i>INS-IGF2</i> , <i>TH</i> , <i>DUSP8</i> , <i>KRTAP5-1</i> , <i>KRTAP5-2</i> , <i>KRTAP5-3</i> , <i>KRTAP5-4</i> , <i>KRTAP5-5</i> , <i>KRTAP5-6</i> , <i>IFITM10</i> , <i>RP11-295K3.1</i> (<i>ENSG00000250644</i>), <i>CTSD</i> , <i>SYT8</i> , <i>TNNI2</i> , <i>LSP1</i> , <i>C11orf89</i> , <i>TNNT3</i> , <i>MRPL23</i> , <i>C11orf21</i> , <i>TSPAN32</i> , <i>CD81</i> , <i>TSSC4</i> , <i>TRPM5</i> , <i>KCNQ1</i> (27)	

Nota: Em negrito os genes comprovadamente causadores.

TABELA 2. LOC/E MARCADORES ASSOCIADOS AO DM1, AGRUPADOS POR CROMOSSOMO.

continuação

#	Cromossomo	Região	SNP	Genes Candidatos (Total)
24	12	12q13.2	rs2292239 rs705704	<i>PMEL</i> , <i>CDK2</i> , <i>RAB5B</i> , <i>SUOX</i> , <i>IKZF4</i> , <i>RPS26</i> , <i>ERBB3</i> , <i>RP11-603J24.9</i> (<i>ENSG00000257411</i>), <i>PA2G4</i> , <i>RPL41</i> , <i>ZC3H10</i> , <i>ESYT1</i> , <i>MYL6B</i> , <i>MYL6</i> , <i>SMARCC2</i> , <i>RNF41</i> , <i>NABP2</i> , <i>SLC39A5</i> , <i>ANKRD52</i> , <i>COQ10A</i> , <i>CS</i> , <i>RP11-</i> <i>977G19.10</i> (<i>ENSG00000144785</i>), <i>CNPY2</i> , <i>PAN2</i> , <i>IL23A</i> , <i>STAT2</i> , <i>APOF</i> , <i>OR6C70</i> , <i>OR6C68</i> , <i>OR6C4</i> , <i>OR2AP1</i> , <i>OR10P1</i> , <i>METTL7B</i> , <i>ITGA7</i> , <i>BLOC1S1</i> , <i>RP11-</i> <i>644F5.10</i> (<i>ENSG00000258311</i>), <i>RDH5</i> , <i>CD63</i> , <i>GDF11</i> , <i>SARNP</i> , <i>ORMDL2</i> , <i>DNAJC14</i> , <i>MMP19</i> , <i>WIBG</i> , <i>DGKA</i> , <i>TIMELESS</i> , <i>MIP</i> , <i>SPRYD4</i> , <i>GLS2</i> , <i>RBMS2</i> , <i>BAZ2A</i> , <i>ATP5B</i> , <i>PTGES3</i> , <i>NACA</i> , <i>PRIM1</i> , <i>HSD17B6</i> (56)
25	12	12q14.1	rs10877012	<i>KIF5A</i> , <i>PIP4K2C</i> , <i>DTX3</i> , <i>ARHGEF25</i> , <i>SLC26A10</i> , <i>B4GALNT1</i> , <i>OS9</i> , <i>AGAP2</i> , <i>AGAP2-AS1</i> , <i>TSPAN31</i> , <i>CDK4</i> , <i>MARCH9</i> , <i>CYP27B1</i> , <i>METTL1</i> , <i>METTL21B</i> , <i>RP11-</i> <i>571M6.15</i> (<i>ENSG00000257921</i>), <i>TSFM</i> , <i>AVIL</i> , <i>CTDSP2</i> , <i>XRCC6BP1</i> , <i>TMEM194A</i> , <i>NAB2</i> , <i>STAT6</i> , <i>LRP1</i> , <i>NXPH4</i> , <i>SHMT2</i> , <i>NDUFA4L2</i> , <i>STAC3</i> , <i>RP11-123K3.4</i> (<i>ENSG00000258830</i>), <i>R3HDM2</i> , <i>INHBC</i> , <i>INHBE</i> , <i>GLI1</i> , <i>ARHGAP9</i> , <i>MARS</i> , <i>DDIT3</i> , <i>MBD6</i> , <i>DCTN2</i> , <i>RP11-362K2.2</i> (40)
26	12	12q24.12	rs3184504 rs17696736	<i>CUX2</i> , <i>FAM109A</i> , <i>SH2B3</i> , <i>ATXN2</i> , <i>BRAP</i> , <i>ACAD10</i> , <i>RP11-162P23.2</i>

				(<i>ENSG00000257767</i>), <i>ALDH2</i> , <i>MAPKAPK5</i> , <i>TMEM116</i> , <i>ERP29</i> , <i>NAA25</i> , <i>TRAFD1</i> , <i>HECTD4</i> , <i>RPL6</i> , <i>PTPN11</i> , <i>RPH3A</i> , <i>CCDC63</i> , <i>MYL2</i> , <i>OAS1</i> , <i>OAS3</i> , <i>OAS2</i> , <i>DTX1</i> (23)
27	13	13q32.3	rs9585056	GPR183 , <i>UBAC2</i> , <i>GPR183</i> , <i>TM9SF2</i> , <i>SLC15A1</i> , <i>DOCK9</i> , <i>CLYBL</i> , <i>ZIC5</i> , <i>ZIC2</i> (10)
28	14	14q24.1	rs1465788	<i>ZFP36L1</i> , <i>RAD51B</i> , <i>ACTN1</i> , <i>DCAF5</i> , <i>EXD2</i> , <i>GALNT16</i> (8)
29	14	14q32.2	rs4900384	<i>C14orf64</i> (1)
30	14	14q32.2	rs941576	<i>MEG3</i> , <i>SLC25A47</i> , <i>WARS</i> , <i>WDR25</i> , <i>BEGAIN</i> , DLK1 , <i>RTL1</i> , <i>AL117190.3</i> (<i>ENSG00000269375</i>) (8)
				continua
31	15	15q14	rs12908309	<i>C15orf53</i> , RASGRP1 , <i>SPRED1</i> , <i>FAM98B</i> (4)
32	15	15q25.1	rs3825932	<i>ADAMTS7</i> , CTSH , <i>MORF4L1</i> , <i>RASGRF1</i> , <i>ACSBG1</i> , <i>DNAJA4</i> , <i>WDR61</i> , <i>CRABP1</i> , <i>IREB2</i> , <i>HYKK</i> , <i>AC027228.1</i> (<i>ENSG00000268838</i>), <i>PSMA4</i> , <i>CHRNA5</i> , <i>CHRNA3</i> , <i>CHRNA4</i> , <i>ANKRD34C</i> , <i>TMED3</i> , <i>KIAA1024</i> (20)
33	16	16p13.13	rs12708716 rs12927355	<i>CIITA</i> , <i>CLEC16A</i> , DEXI , <i>ATF7IP2</i> , <i>EMP2</i> , <i>TEKT5</i> , <i>NUBP1</i> , <i>TVP23A</i> , <i>RM12</i> , <i>SOCS1</i> , <i>TNP2</i> , <i>PRM3</i> , <i>PRM2</i> , <i>PRM1</i> , <i>CTD-3088G3.8</i> , <i>LITAF</i> , <i>SNN</i> , <i>TXNDC11</i> (18)

Nota: Em negrito os genes comprovadamente causadores.

TABELA 2. LOC/E MARCADORES ASSOCIADOS AO DM1, AGRUPADOS POR CROMOSSOMO.

continuação

#	Cromossomo	Região	SNP	Genes Candidatos
37	17	17q21.2	rs7221109	CCR7, SMARCE1, KRT222, KRT222, KRT24, THRA, NR1D1, MSL1, CASC3, RAPGEFL1, WIPF2, CDC6, RARA, CTD-2267D19.3 (ENSG00000266208), GJD3, TOP2A, IGFBP4, TNS4, KRT25, KRT26, KRT27, KRT28, KRT10, TMEM99, KRT12, KRT20, KRT23, KRT39, KRT40, KRTAP3-3, KRTAP3-2, KRTAP3-1, KRTAP1-5, KRTAP1-4, KRTAP1-3, KRTAP1-1, KRTAP2-1, KRTAP2-2, KRTAP2-3, KRTAP4-7, KRTAP4-8, KRTAP4-16P, KRTAP4-9, KRTAP4-11, KRTAP4-12, KRTAP4-5, KRTAP4-4, KRTAP4-3, KRTAP4-2, KRTAP4-1, KRTAP9-1 (51)
38	18	18p11.21	rs1893217 rs2542151	CIDEA, TUBB6, AFG3L2, SLMO1, SPIRE1, AP005482.1 (ENSG00000215527), PSMG2, CEP76, SEH1L, CEP192, LDLRAD4, PTPN2 , (12)
39	18	18q22.2	rs763361	CD226 , DOK6, RTTN, SOCS6, RP11-41O4.1 (5)

Nota: Em negrito os genes comprovadamente causadores.

TABELA 2. LOC/E MARCADORES ASSOCIADOS AO DM1, AGRUPADOS POR CROMOSSOMO.

continuação

#	Cromossomo	Região	SNP	Genes Candidatos
40	19	19p13.2	rs2304256	ICAM1, ICAM4, ICAM5, ZGLP1, FDX1L, CTD-2369P2.10 (ENSG00000167807), CTD-2369P2.12 (ENSG00000267303), RAVR1, ICAM3, TYK2, CDC37, PDE4A, KEAP1, S1PR5, ZNF846, FBXL12, UBL5, PIN1, OLFM2, COL5A3, RDH8, C19orf66, ANGPTL6, PPAN-P2RY11, PPAN, P2RY11, EIF3G, DNMT1, S1PR2, MRPL4, ATG4D, KRI1, CDKN2D, AP1M2, SLC44A2, AC011475.1 (ENSG00000226104), ILF3, QTRT1, DNM2, TMED1, C19orf38, CARM1, YIPF2, C19orf52, SMARCA4 (45)
41	19	19q13.32	rs425105	<i>DACT3, FKRP, PRKD2, SLC1A5, STRN4, IGFL2, IGFL1, HIF3A, PPP5C, CCDC8, PNMAL1, PPP5D1, PNMAL2, AC011484.1 (ENSG00000204850), CALM3, PTGIR, GNG8, AP2S1, ARHGAP35, NPAS1, TMEM160, ZC3H4, SAE1, BBC3, CCDC9, PRR24, C5AR1 (27)</i>

continua

Nota: Em negrito os genes comprovadamente causadores.

TABELA 2. LOC/E MARCADORES ASSOCIADOS AO DM1, AGRUPADOS POR CROMOSSOMO.

continuação

#	Cromossomo	Região	SNP	Genes Candidatos
42	19	19q13.33	rs601338	<i>SULT2B1</i> , <i>FAM83E</i> , <i>SPACA4</i> , <i>RPL18</i> , <i>SPHK2</i> , <i>DBP</i> , <i>CA11</i> , <i>NTN5</i> , <i>FUT2</i> , <i>MAMSTR</i> , <i>RASIP1</i> , <i>IZUMO1</i> , <i>FUT1</i> , <i>FGF21</i> , <i>PLA2G4C</i> , <i>LIG1</i> , <i>C19orf68</i> , <i>ZNF114</i> , <i>CARD8</i> , <i>CCDC114</i> , <i>EMP3</i> , <i>TMEM143</i> , <i>SYNGR4</i> , <i>KDELRL1</i> , <i>GRIN2D</i> , <i>GRWD1</i> , <i>KCNJ14</i> , <i>CTC-273B12.7</i> (<i>ENSG00000268465</i>), <i>CYTH2</i> , <i>LMTK3</i> , <i>BCAT2</i> , <i>HSD17B14</i> , <i>PLEKHA4</i> , <i>PPP1R15A</i> , <i>TULP2</i> , <i>NUCB1</i> , <i>DHDH</i> , <i>BAX</i> , <i>FTL</i> , <i>GYS1</i> , <i>RUVBL2</i> , <i>LHB</i> , <i>CGB</i> , <i>CGB2</i> , <i>CGB7</i> , <i>NTF4</i> , <i>KCNA7</i> , <i>SNRNP70</i> , <i>LIN7B</i> , <i>C19orf73</i> , <i>PPFIA3</i> , <i>HRC</i> , <i>TRPM4</i> (53)
43	20	20p13	rs2281808	<i>SIRPD</i> , RP4-576H24.4 (<i>ENSG00000260861</i>), <i>SIRPB1</i> , <i>SIRPG</i> , <i>PSMF1</i> , <i>TMEM74B</i> , <i>C20orf202</i> , <i>RAD21L1</i> , <i>SNPH</i> , <i>SDCBP2</i> , AL136531.1 (<i>ENSG00000203630</i>), <i>FKBP1A</i> , <i>NSFL1C</i> , <i>SIRPB2</i> , <i>SIRPA</i> , <i>PDYN</i> , <i>STK35</i> (17)
44	21	21q22.3	rs11203203	<i>TMPRSS3</i> , <i>UBASH3A</i> , <i>C2CD2</i> , <i>ZBTB21</i> , <i>UMODL1</i> , <i>C21orf128</i> , <i>ABCG1</i> , <i>TFF3</i> , <i>TFF2</i> , <i>TFF1</i> , <i>RSPH1</i> , <i>SLC37A1</i> , <i>PDE9A</i> , <i>WDR4</i> , <i>NDUFV3</i> (15)

continua

Nota: Em negrito os genes comprovadamente causadores.

TABELA 2. *LOC*/E MARCADORES ASSOCIADOS AO DM1, AGRUPADOS POR CROMOSSOMO.

continuação

#	Cromossomo	Região	SNP	Genes Candidatos
45	22	22q12.2	rs5753037	NF2, CABP7, ZMAT5, UQCR10, ASCC2, MTMR3, HORMAD2, LIF, OSM, EMID1, RHBDD3, EWSR1, GAS2L1, RASL10A, AP1B1, RFPL1, NEFH, THOC5, NIPSNAP1, GATSL3, RP1-130H16.18 (ENSG00000248751), TBC1D10A, SF3A1, CCDC157, RNF215, SEC14L2, MTFP1, SEC14L3, SEC14L4, SEC14L6, GAL3ST1, PES1, TCN2, SLC35E4, DUSP18, OSBP2 (36)
46	22	22q12.3	rs229541	<i>C1QTNF6</i> , <i>IL2RB</i> , <i>RAC2</i> , <i>SSTR3</i> , <i>CACNG2</i> , <i>IFT27</i> , <i>PVALB</i> , <i>NCF4</i> , <i>CSF2RB</i> , <i>TEX33</i> , <i>TST</i> , <i>MPST</i> , <i>KCTD17</i> , <i>TMPRSS6</i> , <i>CYTH4</i> , <i>ELFN2</i> , <i>MFNG</i> , <i>CARD10</i> , <i>CDC42EP1</i> , <i>LGALS2</i> , <i>GGA1</i> , <i>SH3BP1</i> , <i>PDXP</i> , <i>LGALS1</i> , <i>NOL12</i> , <i>TRIOBP</i> (26)

continua

Nota: Em negrito os genes comprovadamente causadores.

TABELA 2. *LOC*I E MARCADORES ASSOCIADOS AO DM1, AGRUPADOS POR CROMOSSOMO.

conclusão

Região	SNP	Genes Candidatos		
47	X	Xq28	rs2664170	<i>ATP6AP1, GDII, FAM50A, PLXNA3, LAGE3, UBL4A, SLC10A3, FAM3A, G6PD, IKBKG, CTAG1A, CTAG1B, CTAG2, GAB3, DKC1, MPP1, SMIM9, F8, H2AFB1, F8A1, FUNDC2, LICAM, LCA10, AVPR2, ARHGAP4, NAA10, RENBP, HCFC1, TMEM187, IRAK1, MECP2, OPN1LW, TEX28P2, OPN1MW, TKTL1, FLNA, EMD, RPL10, DNASE1L1, TAZ, MTCPI, CMC4, BRCC3, VBPI, RAB39B, CLIC2, H2AFB2, F8A2, TMLHE (49)</i>
Total	47	46	64	1093

Fonte: www.T1DBase.org (2014)

Nota: Em negrito os genes comprovadamente causadores.

De acordo com T1Dbase (www.T1DBase.org; HULBERT *et al.*, 2007), muitas destas regiões têm mostrado associação com DM1 (pelo menos em algumas populações), e acredita-se que nestas regiões há genes com susceptibilidade à doença. As regiões variam em tamanho e número de genes, alguns contêm vários, até 277 genes no caso do *locus* IDDM4 no cromossomo 11q. Para a maioria dos *locus*, a variação da sequência responsável pela associação não foi identificada (ATKINSON *et al.*, 2005). Esse problema não é exclusivo para DM1, outras doenças humanas complexas apresentam a mesma dificuldade. Uma série de abordagens de bioinformática/integradoras tem sido desenvolvidas para priorizar e restringir a lista de genes candidatos obtidos com forte associação, incluindo outros tipos de dados dos genes, como os padrões de expressão, anotações ontológicas.

Apesar da existência de associação entre esses *loci* já ser repetidamente replicada, a localização de genes e variantes de causalidade

está em curso e os mecanismos pelos quais as variantes influenciam o risco para DM1 ainda não foram determinados. A região do HLA de classe II foi aceita como importante para DM1 por mais de 20 anos (TODD *et al.*, 1987; CUCCA *et al.*, 2001), mas só recentemente foram publicados dados mais conclusivos com dados replicados por outros pesquisadores esclarecendo a participação de outros genes na etiologia da doença independentes dos genes de HLA de classe I (*HLA-A* e *HLA-B*) (NEJENTSEV *et al.*, 2007; HOWSON *et al.*, 2009), como será visto nos tópicos seguintes.

2.2.2.1. Genes do MHC

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) é uma região de 3,6 Mb localizada em 6p21.3 entre genes flanqueadores da glicoproteína do oligodendrocito da mielina (*MOG*) (telômeros) e colágeno, tipo XI, alfa2 (*COL11A2*) (centromérica). A região é essencial para o sistema imunológico e é conhecida por conter uma densidade extremamente alta de 224 *loci* gênicos (HORTON *et al.*, 2004). Alguns desses genes e certas regiões do MHC estendido, que inclui também 3,9 Mb teloméricas e 0,2 Mb extensões centroméricas, foram identificados como envolvidos na etiologia do DM1. Apesar do MHC ser geralmente considerado como uma região rica em genes associados ao DM1, o efeito dos genes HLA de classe II é de difícil elucidação, uma vez que existem genes que apresentam fator de risco e outros fatores de proteção na mesma região. Como o desequilíbrio de ligação dentro dessa região é alto (ALPER, *et al* 2006; DE BAKKER, *et al* 2006), isso dificulta a identificação dessas associações por meio de metodologias convencionais. O polimorfismo dos genes *DRB1* (762 alelos), *DQA1* (35 alelos) e *DQB1* (107 alelos) (EMBL-EBI 2010) e as complexas interações gênicas na região complicam ainda mais o problema.

Além dos fatores ambientais, há um forte componente genético para a patogênese do *Diabetes mellitus* do tipo 1 autoimune (DM1A), dos quais o antígeno leucocitário humano (HLA), em especial a região de classe II (DR e DQ), são responsáveis por 40 a 50% dos casos de DM1 em estudos de família

(GILLESPIE *et al.*, 2002; TODD *et al.*, 2007). Isso foi evidenciado com uma maior frequência de *DR3*, *DR4*, *DQ2* e *DQ8*, e menor de *DR15* ou alelos *DQ6.2* entre pacientes com DM1, assim, atribuindo um papel de susceptibilidade e proteção respectivamente, para estes alelos na patogênese de DM1 (KOCKUM *et al.*, 1999; IONESCU TIRGOVISTE *et al.*, 2001; AL-JENAI DI *et al.*, 2005).

O fato de que nem todos os portadores de uma variante DR ou DQ específico de alto risco irá desenvolver a doença. O desequilíbrio de ligação forte entre os alelos seletos de *DRB1* e *DQB1* (STEENKISTE *et al.*, 2007) indicam que a patogênese do DM1 resulta da interação complexa entre vários genes da região de classe II, em que haplótipos específicos *DRB1-DQB1* contribuem para a suscetibilidade à doença. Assim, o aumento ou a diminuição da frequência de haplótipos *DRB1-DQB1* em pacientes DM1 sugerem susceptibilidade ou proteção, respectivamente (KAWABATA *et al.*, 2002; PASCHOU *et al.*, 2004; AL-JENAI DI *et al.*, 2005).

O efeito de susceptibilidade ou proteção desaparece quando um alelo diferente de *DRB1* e *DQB1* substitui um alelo específico no haplótipo (TEMAJO *et al.*, 2009, SHE *et al.*, 2009). Os haplótipos HLA específicos para a susceptibilidade ao DM1 são dependentes da etnicidade da população estudada, que foi destacado pela associação positiva de *DRB1* * 030101-*DQB1* * 0201 e *DRB1* * 040101-*DQB1* * 0302 com DM1 entre os haplótipos Euro-descendentes (IONESCU-TIRGOVISTE *et al.*, 2001; AL-JENAI DI *et al.*, 2005) em comparação com *DRB1* * 0405-*DQB1* * 0401 e *DRB1* * 0901-*DQB1* * 0303 haplótipos de DM1 em japoneses (KAWABATA *et al.*, 2002), enquanto *DRB1* * 1501-*DQB1* * 0602 parece ter efeito protetor de DM1 em todas as populações (IONESCU-TIRGOVISTE *et al.*, 2001; KAWABATA *et al.*, 2002; AL-JENAI DI *et al.*, 2005).

Em outro estudo foi descrito uma associação entre alelos e haplótipos do HLA *DRB1* e *DQB1* em pacientes com DM1 (n = 50) e controles (n = 50) da Tunísia e foram identificados dois haplótipos de susceptibilidade (*DRB1* * 030101-*DQB1* * 0201 e *DRB1* * 040101-*DQB1* * 0302), mas nenhum haplótipo de proteção (STAYOUSSEF *et al.*, 2009). Estes dados indicam que a associação de um determinado alelo do HLA e haplótipo *DRB1-DQB1* com DM1 deve ser avaliada no contexto étnico-racial específico (SHE *et al.*, 1996).

Estudos de genes candidatos e estudos genômicos de associação (GWA) identificaram mais de 40 *loci* não pertencentes ao HLA que conferem risco para DM1 (BARRETT *et al.*, 2009; WALLACE *et al.*, 2009). Ainda assim, HLA-*DRB1*,-*DQA1* e-*DQB1* continuam sendo os fatores genéticos mais fortes (KOELEMAN *et al.*, 2004; ERLICH *et al.*, 2008). Em particular, os haplótipos *DRB1* * 0401-*DQA1* * 0301-*DQB1* * 0302 e *DRB1* * 0301-*DQA1* * 0501-*DQB1* * 0201 conferem maior risco (OR = 8,3; $p = 1,7 \times 10^{-42}$; OR = 6.6; $p = 7,3 \times 10^{-23}$, respectivamente) na maioria das populações, enquanto *DRB1* * 15-*DQA1* * 01-*DQB1* * 06 é o mais protetor (OR = 0,0; $1,1 \times 10^{-27}$) de uma forma dominante (KOELEMAN *et al.*, 2004).

Em um estudo conduzido por ERLICH *et al.*, (2009), o alelo não usual (A) do polimorfismo não conservativo Pro-Thr (C883A) do gene de fator de transcrição 7 (*TCF7*) foi associado com DM1 no subconjunto dos casos de DM1 que não têm o genótipo heterozigoto *DR3/DR4-DQB1**0302, que é conhecido por conferir alto risco para DM1. Os dados foram estratificados para o genótipo HLA-*DR3/DR4*, com o fundamento de que o modesto efeito esperado do polimorfismo do gene pode ser mais difícil de discernir, na presença do genótipo HLA de alto risco, que na sua ausência. Nenhuma associação com DM1 foi observada em pacientes de risco já elevado devido à presença do genótipo *DR3/DR4*. (ERLICH *et al.*, 2009).

Em um estudo de associação do genoma para DM1 foram identificadas quatro loci em 12q24, 12q13, 16p13 e 18p11 (TODD *et al.*, 2006). A região entre o HLA de classe I e II, conhecida como classe III, contém uma série de genes envolvidos na resposta inflamatória e imune, tais como fator de necrose tumoral (*TNF*) e lymphotoxina (*LTA*) (NOBLE *et al.*, 2006). Ambos os genes medeiam semelhantes efeitos pleiotrópicos e se ligam aos mesmos receptores TNF (FEUGEAS *et al.*, 1997). Várias células do sistema imune ativado (monócitos, macrófagos e células natural killer) liberam TNF, o que induz a expressão de moléculas de HLA de classe II na superfície das células do sistema imune (MAKHATADZE *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 2002). TNF é creditado por ser uma das principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas na destruição de células β pancreáticas (YANG *et al.*, 1994). Foi mostrado em um modelo animal que o TNF pode ser, em conjunto com interleucina-1 e interferon- γ ,

tóxico para as células- β (RABINOVITCH *et al.*, 1998). Além disso, ratos diabéticos não obesos (NOD) que expressam TNF- α em suas células- β estão predispostos a diabetes (VAUX *et al.*, 2000). Tratamento neonatal do TNF mostrou resultado em camundongos NOD de um início mais precoce e maior incidência de DM1, porém, a administração de TNF em camundongos NOD adultos os impede de desenvolver DM1 (YANG *et al.*, 1994). Além disso, a administração de TNF recombinante à cultura de órgãos timo fetais tem um impacto significativo no desenvolvimento de células T, prevenindo o DM1 (MIDDLEBROOK *et al.*, 2007).

A região do MHC de classe III do ser humano é constituída por uma sequência de 700 kb localizada entre as regiões da centromérica classe II (HLA-DRA) e teloméricas da classe I (MICB), e codifica mais de 60 genes, resultando em uma das regiões gênicas mais densas do genoma humano (NOBLE *et al.*, 2006). Estes genes incluem aqueles envolvidos na cascata de ativação do sistema complemento (C2, o fator B (BF), C4), síntese hormonal (esteroide 21-hidroxilase, CYP21), inflamação e estresse celular (fator de necrose tumoral (TNF α), linfotoxinas α e β , 70 kD proteínas de choque térmico (HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L), a organização da matriz extracelular (tenascina (TNX)), bem como membros da superfamília das imunoglobulinas (Ig-SF) (1c7, G6f e G6B). A maioria dos outros *loci* estão envolvidos principalmente em funções biológicas mais “intrínsecas”, sem implicação imediata para o sistema imune (O CONSÓRCIO DE SEQUENCIAMENTO MHC *et al.*, 1999; HAUPTMANN *et al.*, 2004).

Muitos estudos têm corroborado que outros genes na região de classe III estão associadas com a susceptibilidade de desordens autoimunes, incluindo a DM1 (VALDES *et al.*, 2009). Por exemplo, a deficiência do complemento (C4A/C4B) tem sido associada com maior risco de DM1 e menor idade de início da condição entre indivíduos DR3/DR4; outro exemplo, mostra que polimorfismos dos genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe I de cadeia relacionada do tipo A (MICA), foram associadas com susceptibilidade ao DM1 e menor idade de início, no entanto, os resultados são heterogêneos e não são totalmente consistentes (ALIZADEH *et al.*, 2007), e um terceiro exemplo, é o papel do fator de necrose tumoral de citocinas (TNF- α) na

patogênese de doenças autoimunes (PRICE *et al.*, 2004). Em todos estes casos, estas associações podem refletir desequilíbrio de ligação com outros genes causadores, na região de classe III, ou de outra região, ao invés de um papel direto destes genes. A meta-análise de dados do *MICA* é particularmente ilustrativo desta possibilidade (ALIZADEH *et al.*, 2007). Além disso, estudos funcionais do gene *BAT1*, que está entre os genes *TNFA* e *HLA-B* de classe I, mostra o como sendo um gene candidato para DM1A e outras doenças autoimunes (WONG *et al.*, 2003; PRICE *et al.*, 2004).

Em um estudo de 886 famílias com DM1 (VALDES *et al.*, 2009), foi aplicado um método condicional de genotipagem para detectar associações entre as variantes na região do MHC de classe III e risco de doença após o ajuste para o efeito-*DRB1 * DQB1*. Foram testados 356 SNPs dentro do MHC de classe III e identificados 13 polimorfismos que apresentaram associação significativa com risco de DM1 após o ajuste para múltiplos testes e condicionamento para o genótipo-*DRB1 * DQB1*, tanto no caso da descoberta (n = 289 famílias) e conjuntos de dados na replicação (n = 597 famílias). (VALDÉS *et al.*, 2010). Essas famílias fazem parte do conjunto pertencente ao consórcio de genética de diabetes do tipo 1 (T1DGC) de pedigrees eurodescendentes com tipagem molecular para o HLA disponíveis na época (VALDES *et al.*, 2009). Postulou-se que, se esses SNPs forem verdadeiramente implicados no risco genético de DM1, eles afetariam o risco dos haplótipos altamente predisponentes *DRB1-DQB1 DR3* e *DR4*, mesmo após a confirmação dos alelos de *DPB1* ou HLA-A e HLA-B de classe I (VALDÉS *et al.*, 2010).

A citocina LTA é produzida por linfócitos e medeia um grande número de respostas inflamatórias, imuno-estimulatórios e antiviral (NOBLE *et al.*, 2006). O papel da LTA foi demonstrado como essencial para o desenvolvimento normal dos órgãos linfóides secundários em modelos de camundongos (DE TOGNI *et al.*, 1994). Foi demonstrado que a administração de LTA em camundongos NOD e ratos Bio-Breeding (BB) pode modificar a autoimunidade e impedir o desenvolvimento do DM1 (TAKAHASHI *et al.*, 1993). FEUGEAS *et al.*, (1997), observaram menor produção de LTA em pacientes com DM1 que nos controles normais, sugerindo que um defeito de produção LTA pode ser um fator de risco

para DM1. A correlação genética entre os genes *TNF* e *LTA* com DM1 é amplamente sugerida, apesar de alguns estudos que mostram que a associação entre alelos do *locus* *TNF / LTA* e DM1 pode ser atribuída ao desequilíbrio de ligação com os haplótipos suscetíveis *DQB1-DRB1*, em vez de um efeito independente (DEJA *et al.*, 2006; NOBLE *et al.*, 2006). No entanto, vários outros estudos encontraram um efeito independente do *TNF / LTA* com DM1 (KRIKOVSKY *et al.*, 2002; BOUQBIS *et al.*, 2003; DAS *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2007). O envolvimento do *TNF* na destruição de células β pancreáticas (YANG *et al.*, 1994; RABINOVITCH *et al.*, 1998;) e múltiplas atividades inflamatórias das citocinas *LTA* possibilitam quando analisadas em conjunto mais informações para definir o risco/proteção para a susceptibilidade de DM1 (FEUGEAS *et al.*, 1997, BOUQBIS *et al.*, 2003).

Os genes do *TNF* e *LTA* se encontram em 6p21.3. De acordo com MAKHATADZE *et al.*, (1998) estão localizados dentro do complexo HLA. Dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do promotor do gene *TNF*, G-238A (rs361525) e G-308A (rs1800629), têm sido frequentemente estudados (DENG *et al.*, 1996; KRIKOVSKY *et al.*, 2002; BOUQBIS *et al.*, 2003; KUMAR NOBLE *et al.*, 2006; DEJA *et al.*, 2006; DAS *et al.*, 2006; *et al.*, 2007; STAYOUSSEF, *et al.* 2008). No entanto, inconsistências na designação dos SNPs através de estudos dos diferentes genes de *LTA* tornam difícil distinguir e diferenciar os SNPs investigados (FEUGEAS *et al.*, 1997; BOUQBIS *et al.*, 2003; NOBLE *et al.*, 2006; STAYOUSSEF *et al.*, 2008). Estudos realizados em populações do Norte da Índia, Hungria, Bahrein e Marrocos observaram associações de SNP - 308 do *TNF* e haplótipos *TNF/LTA* com DM1, independentemente do *loci* HLA (KRIKOVSKY *et al.*, 2002; BOUQBIS *et al.*, 2003; DAS *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2007; STAYOUSSEF *et al.*, 2008). Por outro lado, associações *TNF/LTA* com DM1 em chineses, eurodescendentes, e populações polonesas foram explicados pela dependência de alelos HLA (DENG *et al.*, 1996; NOBLE *et al.*, 2006; DEJA *et al.*, 2006).

2.2.2.2. Genes fora da região do MHC

O gene candidato conhecido como membro da família do fator de transcrição do “HMG-box” do gene do fator de transcrição 7 (*TCF7*) foi associado com DM1 (NOBLE, *et al* 2003). Expressão de *TCF7* está limitada a células T e células NK (ROOSE *et al.*,1999) em que o produto do gene β -*catenina* se liga e promove a expressão de mRNA de *lociTh1* específicas, incluindo *R β 2-IL12*. (GULER *et al.*,1999) Um dos estudos iniciais para a associação dos polimorfismos localizados no gene *TCF7* com risco para DM1 relatou a existência de um único SNP, referido anteriormente como C883A, pelo Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) na análise dos dados de genotipagem de 283 eurodescendentes, de famílias multiplex do repositório do Intercâmbio de Dados Biológicos Humanos (HBDI). O SNP C883A do *TCF7* está localizado na posição indicada pelo rs5742913, e este polimorfismo é relatado como sendo tri-alélico (A/C/T), sendo a mudança mais comum de C para A e mais raramente de C para T (ERLICH *et al.*, 2009).

Em estudos anteriores foram incluídos também dados de um SNP adicional do *TCF7* (A383T, rs244656), bem como cinco SNPs à 5 Mb de C883A na região 5q31 (QCA 2 I117T, rs25882; C4045T *IL13*, íntron 13, rs1295686; R111Q *IL13*, rs20541; *IL4* C582T, -590, rs2243250; *IL9* T113M, rs2969885). (NOBLE *et al.*,2003) No “projeto T1DGC de resposta rápida”, (MARRON *et al.*,1997;) SNPs localizados dentro da sequência do gene *TCF7* foram genotipados utilizando a tecnologia IPLEX Sequenom na coleção T1DGC dos trios DM1. Para o SNP rs5742913, a análise de dados original não apresentou variantes com o alelo T e foi sugerido que o SNP foi monomórfico na amostra analisada. A Reanálise dos dados para a presença do alelo A na posição rs5742913, entretanto, revelou uma associação de DM1 com o alelo A, portanto, replicando a conclusão anterior. Os dados apresentados por ERLICH H.A. *et al.*, (2009) também revelam uma associação aparente para DM1 para um SNP intrônico (rs17653687) do *TCF7* que não tinha sido relatada antes.

Outro gene candidato para DM1 estudado no “projeto de resposta rápida” é o *IL4R*, que codifica a cadeia α dos receptores *IL4* e *IL13*. Polimorfismos em *IL4R* foram relatados sendo associados com alergia e asma

(CHATILA *et al.*, 2004;) e o câncer cervical, (IVANSSON *et al.*, 2007), bem como com DM1; (BUGAWAN *et al.*, 2002; MIREL *et al.*, 2002) vários SNPs não sinônimos do IL4R têm sido associados a diferenças na sinalização (BUGAWAN *et al.*, 2002).

O segundo *locus* principal de susceptibilidade para DM1 é o gene da insulina (*INS*), sendo o primeiro gene candidato escolhido para o presente estudo, localizado em 11p15.5. Além do reconhecido 5' VNTR que fica na região flanqueadora 5' do gene, dois candidatos igualmente qualificados foram identificados, rs689 (-23HphI) e rs3842753. Até o momento, nenhum estudo foi publicado, que pode distinguir claramente estes dois polimorfismos quanto ao impacto sobre o risco de DM1, embora alguns estudos indiquem para a VNTR como a variante causal. O gene *INS* codifica o precursor proinsulina. Quando ativada a insulina age diretamente na regulação do metabolismo de carboidratos e gordura no organismo. Ela faz com que as células do fígado, músculo e células do adipócito absorvam glicose do sangue e guardem-na na forma de glicogênio. (BARRATT *et al.*, 2004).

O gene da proteína tirosina fosfatase não receptor tipo -22 (*PTPN22*) é o terceiro principal *locus* reconhecido por estar associado com a susceptibilidade ao DM1, após *HLA-DR/DQ* e do gene da insulina (*INS*) (BOTTINI *et al.*, 2004; WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM. *et al.*, 2007). A fosfatase linfóide específico (PBP) codificada pelo gene *PTPN22* no cromossomo 1p13 é um excelente candidato para DM1, pois está envolvida na regulação negativa de ativação de células T (CLOUTIER *et al.*, 1999). Um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, rs2476601, T → C) resulta em uma substituição do aminoácido arginina (R) por triptofano (W) no códon 620 (R620W) com a variante de triptofano apresentando maior inibição do receptor de sinal da célula T (BOTTINI *et al.*, 2004; VANG *et al.*, 2005). Como consequência, este "ganho de função" da variante do triptofano está associada a maior risco ao DM1. Embora o alelo de menor frequência (MAF) da rs2476601 varie consideravelmente entre os grupos étnicos, a associação de R620W com DM1 tem sido confirmada em diversas populações (SMYTH *et al.*, 2004; ZHENG *et al.*, 2005; LADNER *et al.*, 2005; QU *et al.*, 2005; STECK *et al.*, 2006).

O *PTPN22* foi identificado como um gene causal para o DM1, (BOTTINI *et al.*, 2004; SMYTH *et al.*, 2004), com um único SNP, o rs2476601 (C1858T codificação R620W) e que foi extensivamente replicada em muitos outros estudos e em diferentes populações (ZHERNAKOVA *et al.*, 2005; STECK *et al.*, 2006). Varias pesquisas focaram em determinar se a variante rs2476601 representa a única associação na região, que até o momento nenhuma outra foi descoberta (SMYTH *et al.*, 2008; HOWSON *et al.*, 2009; www.T1DBase.org (2014)).

Em uma análise de haplótipos do *locus PTPN22*, o alelo de risco 1858T (rs2476601) ocorreu em um único haplótipo que foi fortemente associada com DM1 (ONENGUT GUMUSCU *et al.*, 2006; ZOLEDZIEWSKA *et al.*, 2008). Embora R620W seja uma variante funcional, também faz parte de um longo bloco de desequilíbrio de ligação, que contém numerosos polimorfismos, sugerindo a possibilidade de que outras potenciais variantes funcionais poderiam ser responsáveis pela associação com DM1 (QU H *et al.*, 2005). O SNP rs2476601 da *PTPN22* também é conhecido por estar associado com o risco de outras doenças autoimunes, incluindo a doença de Graves (SMYTH *et al.*, 2004; VELAGA *et al.*, 2004), artrite reumatóide, (BEGOVIĆ *et al.*, 2004) e lúpus eritematoso sistêmico. (KYOGOKU *et al.*, 2004). Foi relatado recentemente que a variante 1858T afeta a progressão da condição pré-clínica para diagnóstico clínico de diabetes em indivíduos positivos para anticorpos celulares da ilhota (ICA - isletcellantibody) (HERMANN *et al.*, 2006;) e confere um efeito aditivo na positividade para a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) (CHELALA *et al.*, 2007), corroborando ainda mais com uma função precoce e geral para esta variante em autoimunidade.

A quarta principal associação com DM1 é a do receptor 2 da interleucina (*IL2RA*), que foi estabelecida usando uma abordagem por tag SNP (VELLA *et al.*, 2005), e replicado em um estudo independente. (QU *et al.*, 2007). Três associações independentes foram posteriormente identificadas na região (LOWE *et al.*, 2007; SMYTH *et al.*, 2008; MAIER *et al.*, 2009) e são dependentes da disposição dos alelos no haplótipo (DENDROU *et al.*, 2009). A associação mais forte é com um grupo de oito SNPs (LOWE *et al.*, 2007). O estudo original usou o rs41295061 para marcar este efeito (LOWE *et al.*, 2007),

mas mais recentemente o rs12722495 tem demonstrado ser um marcador mais eficaz, com um OR de 0,62 (SMYTH *et al.*, 2008). A segunda associação independente é encontrada com o rs11594656, o mais fortemente associado (LOWE *et al.*, 2007). A terceira associação é com o rs2104286, que aparenta não estar em desequilíbrio de ligação com quaisquer outros SNPs (MAIER *et al.*, 2009; DENDROU *et al.*, 2009). O *locus* também está associado com a susceptibilidade para a esclerose múltipla (MAIER *et al.*, 2009).

Em humanos, o próprio gene da *IL-2* e os genes que participam da sinalização de *IL-2R*, incluindo *CD25* e *PTPN2*, têm sido implicados na patogênese do diabetes do tipo 1 (LOWE *et al.*, 2007; WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM *et al.*, 2007; TODD *et al.*, 2007; DENDROU *et al.*, 2008; COOPER *et al.*, 2008; HAKONARSON *et al.*, 2008). No entanto, nenhum estudo demonstrou uma ligação funcional entre sinalização de *IL-2/IL-2R* e déficits de células T reguladoras (Treg) em humanos diagnosticados com diabetes do tipo 1. A manutenção da expressão do gene *FOXP3* é essencial para a função de Tregs in vivo em ratos e seres humanos por ser dependente à cadeia comum de citocinas, com *IL-2* desempenhando um papel principal (FONTENOT *et al.*, 2005; PASSERINI *et al.*, 2008). Foi demonstrado que a manutenção da expressão *FOXP3* em ambas as células T reguladoras naturais (nTregs) e induzidas (iTregs) encontra-se diminuída em células *TCD4/CD25* em indivíduos diabéticos do tipo 1 quando cultivadas na presença de *IL-2*. Isto foi associado com diminuição da sinalização da *IL-2R* em resposta a *IL-2*, medida pela diminuição da fosforilação da *STAT5*, mas não com a expressão de *IL-2R* alterado. Diminuição da fosforilação da *STAT5* está correlacionada com o aumento da expressão da proteína tirosina fosfatase N2 (*PTPN2*) em células T CD4 em indivíduos diabéticos do tipo 1 (LONG *et al.*, 2010).

A região do cromossomo 2q33.2 contendo o gene *CTLA4*, tem sido reconhecida como sendo uma região gênica de susceptibilidade a DM1 desde 1996 e é o quinto principal *locus* (NISTICO *et al.*, 1996). Embora rs231806 (*MH30*), rs7565213 (*JO30*) e rs3087243 (*CT60*) sejam as variantes mais associadas, o desequilíbrio de ligação alto em toda a região e a falta de dados completos de re-sequenciamento têm impedido o aperfeiçoamento da identidade ou localização da variante causal (UEDA *et al.*, 2003; WELLCOME

TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM. ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO GENOMA INTEIRO DE 2007).

Dados apresentados por estudos recentes estendem as associações prévias, agrupando *CTLA-4*, a região *IL2_21*, *SH2B3* (*TNFAIP3*) encontrado na região 6q23, *PRKCQ*, *MME1*, e agora *AGAP* como sendo *loci* de susceptibilidade que são comuns às três doenças autoimunes intimamente relacionados: diabetes do tipo 1, doença celíaca e artrite reumatóide (SMYTH *et al.*, 2008, MARTIN *et al.*, 2009).

O gene linfócito T citotóxico antígeno-4 (*CTLA4*) e o gene que codifica CD28 foram mapeados em 2q33. *CTLA-4* é um receptor de glicoproteína expresso em células T ativadas e *CD28* está envolvido no processo de regulação da ativação de células T por células apresentadoras de antígenos e imunidade celular subsequente (WALUNAS *et al.*, 1996). *CTLA4* tem sido mostrado em vários estudos independentes como um gene candidato envolvido na etiologia das doenças autoimunes, pois *CTLA-4* desempenha um papel na regulação da ativação de células T e, assim como para células T as interações das células B (LANE *et al.*, 1997). De acordo com estudos anteriores sobre a associação entre o desenvolvimento de várias doenças autoimunes com o gene *CTLA4*, o polimorfismo 49 A/G no éxon 1 no gene *CTLA4* foi relatado por ser envolvido no desenvolvimento da doença de Graves (YANAGAWA *et al.*, 1997), Tireoidite de Hashimoto (DONNER *et al.*, 1997), a doença de Addison e artrite reumatóide (GONZÁLES *et al.*, 1999). A associação do DM1 com os polimorfismos *CTLA4* foi relatada por NISTICO *et al.*, (1996) pela primeira vez. Esta associação tem sido adicionalmente relatada por outros estudos em uma variedade de grupos étnicos (MARRON *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2000). Entretanto, em estudos realizados no Japão (YANAGAWA *et al.*, 1999) e Alemanha (OWERBACH *et al.*, 1997; BADENHOOP *et al.*, 1999), a associação dos polimorfismos *CTLA4* com o desenvolvimento do DM1 ainda não foi confirmada.

Outros estudos têm mostrado associações de novos genes com DM1, no entanto com respaldo estatístico fraco e o tamanho amostral muitas vezes pequenos, além de dados não replicados por outros pesquisadores, assim não obtendo resultados convincentes (COOPER *et al.*, 2007).

Dezenove genes candidatos (*INS*, *PTPN22*, *IL2RA*, *CTLA4*, *IFIH1*, *SUMO4*, *VDR*, *PAX4*, *OAS1*, *IRS1*, *IL4*, *IL4R*, *IL13*, *IL-12B*, *CEACAM21*, *CAPSL*, *Q7Z4c4* (5q), *FOXP3*, *EFHB*) para DM1 foram testados em um estudo recente, no entanto, apenas os loci já estabelecidos (*INS*, *CTLA4*, *PTPN22*, *IL2RA*, *IFIH1*), tiveram evidência significativa de associação nas famílias T1DGC (n = 2.240) (HOWSON *et al.*, 2009). Estes dados, como parte do estudo dos genes candidatos pelo consórcio de genética de diabetes do tipo 1 (T1DGC), também foram analisados por outros pesquisadores: *IL4R* e *TCF7* por ERLICH *et al.*, 2009; *SUMO4* por PODOLSKY *et al.*, 2009; *CTLA4*, *IL2RA* e *OAS1* por QU *et al.*, 2009; *PTPN22* por STECK *et al.*, 2009; *IRS1* e *PAX4* por BERGHOLDT *et al.*, 2009 e *IL-12B* por MORAHAN *et al.*, 2009.

Em um resultado relatado recentemente de um GWA para o diabetes do tipo 1 em uma grande amostra de diabéticos pediátricos de ascendência europeia (HAKONARSON *et al.*, 2007), além de confirmar *loci* previamente identificados, observou-se uma associação altamente significativa e replicada com KIAA0350 (agora renomeado *CLEC16A*, pertencente a família de domínio da lectina tipo C 16); (HAKONARSON *et al.*, 2008).

Dentro do gene *CD226*, localizado em 18q22.2, o SNP rs763361 foi encontrado por estar associado com o diabetes do tipo 1 (TODD *et al.*, 2007). O gene *CD226*, membro da superfamília de imunoglobulinas, é expresso como uma glicoproteína na maioria das células do sistema imunológico, incluindo o natural killer (NK), células T, plaquetas, monócitos e um subconjunto de células T mediando sua ativação e diferenciação. (SHIBUYA *et al.*, 1996).

O SNP rs17696736 (gene *NAA25*) está localizado em um grande bloco de desequilíbrio de ligação, que contém vários genes funcionais de relevância para o diabetes do tipo 1 (WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM *et al.*, 2008). O SNP rs6679677 é um SNP intergênico localizado a jusante da proteína básica 1 redonda da espermátide (*RSBN1*) e no sítio promotor do gene do fator de transcrição putativo homeodomínio 1 (*PHTF1*).

O gene *SUMO4* tem uma função importante nas vias de sinalização de NFκB e JAK/STAT e pode regular a atividade de outras moléculas imunes críticas, tais como AP-1 (GUO *et al.*, 2004; GUO *et al.*, 2005; WANG *et al.*,

2008). O SUMO4 está localizado no cromossomo 6, no intervalo IDDM5 em 6q25, uma região candidata para diabetes do tipo I (DM1), de acordo com numerosos estudos de ligação. Vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em torno do gene *SUMO4* estão associados com DM1 (GUO *et al.*, 2004). O SNP associado rs237025 (A → G), do *SUMO4* provoca uma mudança de aminoácidos de metionina (M) para valina (V) na posição 55 (M55V) no éxon 1 do gene. Este SNP foi fortemente associado com DM1, além do fato de que o SNP é um potencial "variante causal" pois a substituição M55V parecia influenciar a atividade do NF- κ B (GUO *et al.*, 2004, WANG *et al.*, 2008).

Posteriormente, essa observação inicial tornou-se um assunto de intenso debate por causa da impossibilidade de replicar a associação em diversas populações caucasianas (SMYTH *et al.*, 2005, QU *et al.*, 2005; KOSOY *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2008). Desde o relatório inicial, uma série de estudos também revelaram associações significativas entre SNPs em *SUMO4* com outras doenças autoimunes (TSURUMARU *et al.*, 2006; GLASER *et al.*, 2007; YOO *et al.*, 2007; DING *et al.*, 2007; HOU *et al.*, 2008), diabetes tipo II, (NOSSO *et al.*, 2007) e as complicações diabéticas. (LIN *et al.*, 2007; RUDOLFSKY *et al.*, 2008). Esses estudos têm fornecido evidências inequívocas de função crítica de *SUMO4* em muitas doenças inflamatórias. Várias questões importantes sobre DM1 e associações com outras doenças com SNPs em *SUMO4* ainda continuam sem resposta. Uma das questões mais importantes é por que a associação *SUMO4*-DM1 é relativamente forte em populações asiáticas, enquanto que a evidência de associação é inconsistente ou não detectável em muitas populações caucasianas. (PODOLSKY *et al.*, 2009)

Entre os genes não-MHC, o *locus* do receptor da vitamina D (*VDR*), localizado em 12q13.11 é um candidato funcional, devido ao seu papel no sistema imunológico e às provas para uma função de protetor da vitamina D no modelo experimental de ratos diabéticos não-obesos (NOD) e em estudos humanos (MATHIEU *et al.*, 1994; HYPONEN *et al.*, 2001; GIULIETTI *et al.*, 2004; VAN ETTEN *et al.*, 2007). A deficiência de vitamina D foi descrita em DM1 e a variação sazonal bem como o status da vitamina D na manifestação DM1 foram correlacionados (GREER *et al.*, 2007; BREKKE *et al.*, 2007; MOHR

et al., 2008). Isto também apoiou uma recomendação geral para a suplementação de vitamina D (HOLICK *et al.*, 2004). Muitos estudos de associação entre VDR e DM1 foram realizados com resultados positivos ou nulos (PANI *et al.*, 2000; MATHIEU *et al.*, 2001; HOLICK *et al.*, 2004; NEJENTSEV *et al.*, 2004; GUO *et al.*, 2006; MIMBACAS *et al.*, 2007; GYSEMANS *et al.*, 2008; LEMOS *et al.*, 2008).

Os genes 2',5'-oligoadenilato sintetase (*OAS1*, *OAS2* *OAS3*), que estão localizados no cromossomo 12q24.13 humano codificam uma família de enzimas fundamental na defesa antiviral inata (JUSTESEN *et al.*, 2000; MASHIMO *et al.*, 2002; PERELYGIN *et al.*, 2002; LUCAS *et al.*, 2003). *OAS1*, tem uma função importante na atividade total das enzimas constitutivas da OAS (BONNEVIE V-NIELSEN *et al.*, 2005). A primeira associação relatada de diabetes tipo I (DM1), com o *locusOAS1* foi com o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs10774671 (FIELD *et al.*, 2005). Este SNP se localiza em uma região que inclui um sítio de splicing. O alelo de menor frequência (G) do rs10774671 introduz um sítio de splicing e está associado com a atividade enzimática aumentada da OAS, além do fato que este SNP foi associado com a susceptibilidade ao DM1 (FIELD *et al.*, 2005). Apesar de limitações metodológicas desse estudo foram posteriormente identificados, (SMYTH *et al.*, 2006;) em um estudo independente uma maior correlação ($r^2 = 0,69$) do SNP rs3741981 não sinônimo (Ser162Gly) do gene *OAS1*, sendo significativamente associado com o risco ao DM1 (TESSIER *et al.*, 2006). Em dois grandes grupos de descendência europeia, no entanto, não foi observada uma associação estatisticamente significativa dos SNPs da *OAS1* com DM1 (SMYTH *et al.*, 2006).

Além disso, recentemente foi publicado um trabalho cujos dados suportam um papel para a enzima de reparo L-isoaspartate (D-aspartato) O-metiltransferase (PIMT) na patogênese do DM1. Essa enzima altamente expressa em células beta humanas, e um indutor desta enzima, atrasam o início do diabetes e reduzem a gravidade da doença em ratos Bio-Breeding (linhagens cultivadas em laboratório como um modelo animal para o DM1) propensos ao diabetes (WAGNER *et al.*, 2007). Camundongos *knock-out* para PIMT exibem um fenótipo autoimune, com aumento da resposta proliferativa

das células T a elementos mitogénicos e estimulação mediada pelos receptores. Além disso, auto-anticorpos anti-DNA são desenvolvidos em camundongos de tipo selvagem que foram transplantados com medula óssea de animais com deficiência de PIMT (DOYLE *et al.*, 2003). Nos humanos, o gene que codifica PIMT (*PCMT1*) está localizado no cromossomo 6q24-25, em uma região do genoma que foi previamente ligada ao DM1 (IDDM5) (COX *et al.*, 2001).

A complexidade do diabetes do tipo 1, a heterogeneidade das frequências alélicas entre as populações e as dificuldades para localizar a verdadeira variante causadora dentro de um bloco de desequilíbrio de ligação recomendam a replicação de análise de SNPs relatados a fim de determinar seu impacto sobre os vários grupos étnicos (WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM *et al.*, 2008).

2.2.2.3. Os Dois Genes Candidatos escolhidos para o presente estudo

As citocinas afetam quase todos os processos biológicos; desde o desenvolvimento embrionário, patogênese de doença, resposta não-específica contra infecções, resposta específica para uma grande gama de antígenos, alterações nas funções cognitivas e progressão dos processos degenerativos do envelhecimento. Além disso, as citocinas são parte da diferenciação de células tronco, a eficácia das vacinas e rejeição de órgãos transplantados. (Dinarelo, 2007)

Em grego: Cito do grego " κύτταρο " kytaro "célula" + Kines do grego " κίνηση " kinisi "movimento") são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30kDa que são importantes na sinalização celular (Oliveira *et al.*, 2011). São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico. Eles são liberados por células e afetam o comportamento de outras células, atuam especialmente por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras) (Lin *et al.*, 2000; Ibelgafts, 2015).

Diferentes tipos de células secretam a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, agindo em pleiotropia. As citocinas são redundantes em suas atividades, ou seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas. Com frequência, são formadas em cascata, ou seja, uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas (Zhang and An, 2007). As citocinas incluem quimiocinas, interferons, interleucinas, linfocinas e fator de necrose tumoral. As citocinas são produzidas por uma ampla variedade de células , incluindo células do sistema imune , como macrófagos , linfócitos B , linfócitos T e mastócitos, bem como as células endoteliais e fibroblastos (Ibelgafts, 2015).

Essas substâncias se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (Zhang and An, 2007). Algumas citocinas

podem ter ações pró (Th1) ou anti-inflamatórias (Th2) (Linfócitos T auxiliares), de acordo com o microambiente no qual estão localizadas. Dentre as consideradas pró-inflamatórias, temos as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e FNT (fator de necrose tumoral). As anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e FTC β (fator transformador de crescimento β) (Curfs *et al.*, 1997).

IL-12B localizado em 5q33.3, um dos genes candidatos escolhidos para o presente trabalho, codifica a subunidade p40 das citocinas interleucina heterodimérica (IL) -12 e IL-23 (LANGRISH *et al.*, 2004; KASTELEIN *et al.*, 2007). Estas citocinas têm diversas funções na resposta imune. Em particular, têm fortes efeitos na determinação da natureza da resposta imune que está sendo montada. *IL-12* influencia células T ativadas para secretar citocinas, típicas da resposta imune inflamatória, enquanto que a *IL-23* participa de recrutamento médio e ativação de células necessárias para a indução da inflamação crônica (LANGRISH *et al.*, 2004; KASTELEIN *et al.*, 2007).

Estas e outras propriedades fazem dessas citocinas e, portanto, *IL-12B*, candidatas para a participação na resposta autoimune desregulada, levando ao DM1. Na verdade, *IL-12* mostrou acelerar DM1 nos camundongos mouse6 NOD propensos a ter diabetes que compartilharam o alelo *IL-12B* com outras cepas susceptíveis a doenças autoimunes (YMER *et al.*, 2002).

O primeiro relato, implicando *IL-12B* na susceptibilidade ao DM1 veio de um estudo de famílias australianas e britânicas (MORAHAN *et al.*, 2001). Estas famílias apresentaram ligação com a porção distal do cromossomo 5 e com alelos localizados na extremidade 3' do gene *IL-12B* que foram diferencialmente transmitidas para a prole afetada. Estes resultados foram posteriormente confirmados em estudos de indivíduos com DM1 dos EUA, (DAVOODI SEMIROMI-A *et al.*, 2002) no Japão, (YANG *et al.*, 2006) e Espanha (SANTIAGO *et al.*, 2005). Outros estudos não confirmam o efeito do *IL-12B* em diferentes regiões geográficas e/ou em outros grupos étnicos (JOHANSSON *et al.*, 2001; MCCORMACK *et al.*, 2002; NISTICO *et al.*, 2002; BERGHOLDT *et al.*, 2004).

É evidente que variantes genéticas de *IL-12B* contribuem para a susceptibilidade a várias doenças que têm em comum uma desregulação imune subjacente. Suporte para esta conclusão acumulou-se através de muitos

estudos. Estas doenças incluem dermatite (TSUNEMI *et al.*, 2002; CAPON *et al.*, 2007) infecções (malária cerebral, tuberculose e hanseníase), (MORAHAN *et al.*, 2002; BOUTLIS *et al.*, 2003; TSO *et al.*, 2004; FREIDIN *et al.*, 2006; MORAHAN *et al.*, 2007; MARQUET *et al.*, 2008), asma (MORAHAN *et al.*, 2002; RANDOLPH *et al.*, 2004;) e, mais recentemente, a síndrome da infância nefrótica córtico-sensível (BERGHAUS MÜLLER *et al.*, 2008). Nestes estudos, os principais efeitos da *IL-12B* têm sido atribuíveis a mutações na região 3'UTR, ou no seu promotor, ou a uma combinação de ambos. Em um importante estudo sobre a psoríase, um SNP, localizado a 60 kb sentido telomérico de *IL-12B*, também foi identificado por contribuir de forma independente à susceptibilidade (CARGILL *et al.*, 2007). Além disso, a demonstração de que polimorfismos em genes diferentes podem ter impacto sobre a expressão da *IL-12B* e produção de *IL-12* enfatiza a complexidade deste sistema (PENG *et al.*, 2006).

Entre várias citocinas, a interleucina-18 (IL-18) é uma citocina única que aumenta a resposta imune derivado tanto do Th1 quanto do Th2 (Linfócitos T auxiliares) (NAKANISHI *et al.*, 2001). IL-18 contribui para a patogênese de DM1 agindo como uma citocina pró-inflamatória, e em sinergia com a interleucina 12 (IL-12), promove o desenvolvimento da resposta dos linfócitos Th1 por indução da produção de Gama-interferon (IFN- γ), modulando atividade das células NK, aumento de TNF-alfa (TNF- α) e produção de IL-1 pelos macrófagos, regula o aumento da expressão de moléculas de aderência, e induz a produção de óxido nítrico na área da inflamação crônica. (MCINNIS *et al.*, 2000; NAKAHIRA *et al.*, 2002). O aumento de IL-18 precede a fase aguda de desenvolvimento de doenças autoimunes como o diabetes (ROTHER *et al.*, 1997), doença de Crohn (MONTELEONE *et al.*, 1999) e Esclerose Múltipla (BALASHOV *et al.*, 1999).

2.2.2.3.1. *IL-12B*

O gene *IL-12B*, com um total de 8 éxons (figura 1), sendo o transcrito primário de maior de comprimento de 16,104pb, desta após splicing, 2761pb formando uma proteína com 328 aminoácidos.

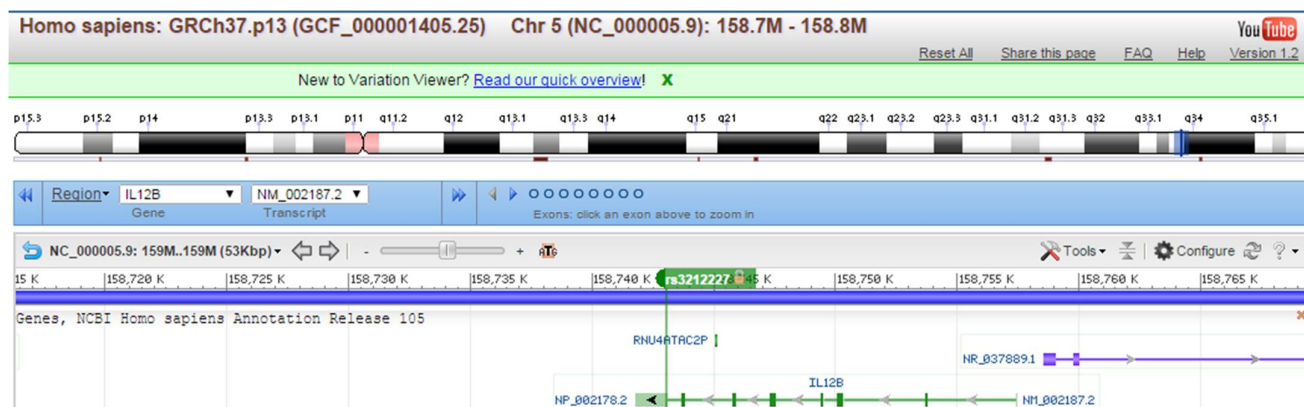


FIGURA 1 - LOCALIZAÇÃO DO GENE *IL-12B* NO CROMOSSOMO 5.

FONTE: NCBI

Nota: A linha horizontal que cruza a região do gene *IL-12B* mostra a localização do SNP *IL-12B* G.*159A>C, 3'UTR.

Função

IL-12B codifica a subunidade p40 das citocinas interleucina heterodimérica IL-12 e IL-23. Com diversas funções na resposta imune. Em particular, têm fortes efeitos na determinação da natureza da resposta imune que está sendo montada. *IL-12* influencia células T ativadas para secretar citocinas típicas da resposta imune inflamatória, enquanto que a *IL-23* de recrutamento médio e ativação de células necessárias para a indução da inflamação crônica.

Associação ao DM1

Estas e outras propriedades fazem dessas citocinas e, portanto, *IL-12B*, os candidatos para a participação na resposta autoimune desregulada levando ao DM1. O primeiro relato, implicando *IL-12B* na susceptibilidade DM1 veio de

um estudo de famílias australianas e britânicas e em outro estudo em uma população Croata (Hadžija et al., 2013).

2.2.2.3.1. *IL-18*

O gene *IL-18*, com um total de 6 éxons (figura 2), tem 6 transcritos primários, sendo o maior de comprimento 20,870pb, desta após splicing, 1147pb formando uma proteína com 193 aminoácidos.

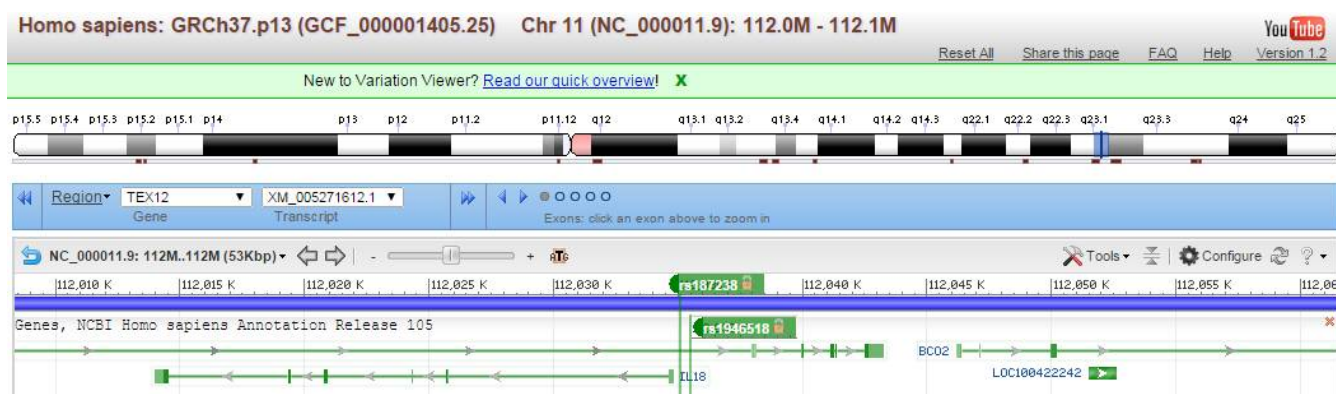


FIGURA 2 - LOCALIZAÇÃO DO GENE *IL-18* NO CROMOSSOMO 11.

FONTE: NCBI

Nota: A linha horizontal que cruza a região do gene *IL-18* mostra a localização dos SNPs g.-137G>C e g.-607C>A.

Função e Associação com DM1

IL-18 contribui para a patogênese de DM1 agindo como uma citocina pró-inflamatória, e em sinergia com a interleucina 12 (*IL-12*) (MCINNES *et al.*, 2000; NAKAHIRA *et al.*, 2002). O aumento de *IL-18* precede a fase aguda de desenvolvimento de doenças autoimunes como o diabetes (ROTHER *et al.*, 1997), doença de Crohn (MONTELEONE *et al.*, 1999) e Esclerose Múltipla (BALASHOV *et al.*, 1999).

Em um estudo croata, mostrou-se estar associada com um maior risco de desenvolvimento da doença em idades mais precoces e pode estar implicado na efetividade do controle glicêmico. (Hadžija et al., 2013)

3. Material e Métodos

3.1 Material

3.1.1 Amostra de DM1

Foi utilizada uma amostra totalizando 1244 pacientes com DM1 de ambos os sexos e de todas as etnias, com idade média de diagnóstico de 14 anos (mínima e máxima de 0 e 55 anos, respectivamente). Essa amostra foi coletada graças aos esforços em conjunto de 13 centros (Figura 3), que normalmente atendem esses pacientes no dia-a-dia, configurados como ambulatórios de diabetes, e participam de um projeto multicêntrico, coordenado pela UERJ (Tabela 3).

TABELA 3 - NÚMERO DE AMOSTRAS DE PACIENTES COM DM1 POR CENTRO.

Centro	Bauru ^a	UFRJ ^b	UERJ ^c	CIDH ^d	Brasília ^e	FMUSP ^f	Belém ^g
Amostras	121	38	107	79	145	143	39
ID Centro	1	2	3	4	5	6	7
Centro	HC-RS ^h	Ceará ⁱ	CEDEBA ^j	Curitiba ^k	UNIFESP ^l	Campinas ^m	
Amostras	146	46	158	57	63	71	
ID Centro	8	9	10	11	12	13	

FONTE: O autor (2014)

Nota: ^a.Universidade Estadual Paulista (UNESP); ^b.Universidade Federal do Rio de Janeiro; ^c.Universidade Estadual do Rio de Janeiro; ^d.Centro Integrado de Diabetes e Hipertensão ; ^e.Universidade de Brasília (UNB); ^f.Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP); ^g.Universidade Federal do Pará (UFPA); ^h.Hospital de Clínicas do Rio Grande do Sul; ⁱ.Universidade Federal do Ceará (UFC); ^j.Centro de Diabetes e Endocrinologia da Bahia; ^k.Universidade Federal do Paraná; ^l.Universidade Federal de São Paulo; ^m.Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP);

3.2 Métodos

3.2.1 Extração de DNA

Foi coletado aproximadamente 5 ml de sangue periférico de forma padronizada através de punção venosa em tubos estéreis com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Foram utilizados Kits comerciais para extração do DNA, um automatizado (SP QIA Symphony) com o equipamento QIA Symphony SP e o outro manual (Qiagen QIAamp DNA Blood Mini) ambos da Qiagen (EUA). Os mesmos divergiam basicamente apenas no método

adotado para a etapa de purificação, com o Kit automatizado esta etapa era realizada com o auxílio de partículas magnéticas enquanto no Kit manual a mesma era realizada por colunas de sílica.

As amostras extraídas foram avaliadas quanto à sua concentração e pureza por meio da densidade óptica em um espectrofotômetro Nanodrop-Thermo Fisher Scientific. A relação entre a quantidade de DNA e de proteínas na amostra é utilizada como parâmetro para avaliação da qualidade do DNA extraído, os valores desta relação foram considerados aceitáveis quando se encontravam entre 1,7 - 2,0. O cálculo utilizado para o ajuste da concentração foi o seguinte:

Concentração desejada X Volume desejado = Concentração inicial X Volume inicial. Sendo que a concentração ideal para a genotipagem é de 20ng/μL.

O valor obtido a partir desta equação representa a quantidade de DNA que deve ser utilizado na diluição, este mesmo valor deve ser subtraído do volume desejado para obtermos o volume de água ultrapura que deve ser adicionado no preparo da amostra.

3.2.3 PCR

3.2.3.1 Genotipagem de SNPs

Para genotipagem dos SNPs g.-137G>C (rs187238) e g.-607C>A (rs1946518) do gene *IL-18* e g.*159A>C (rs3212227), 3'UTR do gene *IL-12B* foi utilizado o kit TaqMan SNP genotyping da Applied Biosystems. Esse kit consiste de 2 iniciadores não marcados e duas sondas (uma para cada alelo) marcadas com os fluoróforos VIC e FAM.

A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR.

As reações foram feitas em um aparelho da ViiA™ 7 de PCR em tempo real da Applied Biosystems

Foram utilizadas para cada reação 5,0 μ L de TaqMan Universal PCR Master Mix, 2,5 μ L de água ultra pura, 0,5 μ L de sonda TaqMan específica para cada SNP e 2 μ L de DNA da amostra (20ng/ μ L).

O protocolo utilizado na máquina para fazer a genotipagem foi: 1) 50°C por 2 minutos; 2) 95°C por 10 minutos; 3) 95°C por 15 segundos, 4) 62°C por 1 minuto (passos 3 e 4 foram repetidas por 50 vezes).

As figuras 4 e 5 mostram um esquema da detecção dos alelos por essa técnica.

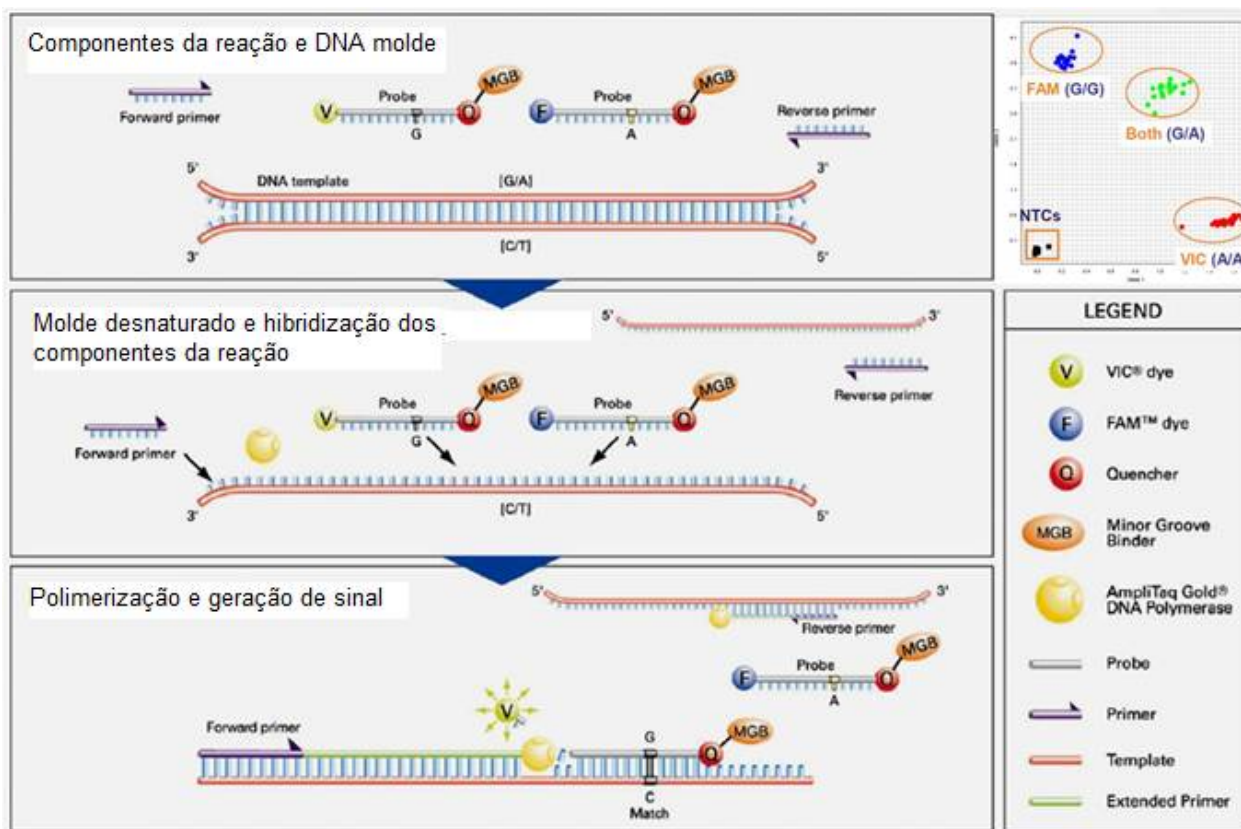


FIGURA 4 - ESTRATÉGIA DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA UTILIZANDO SONDAS MARCADAS COM FLUORESCÊNCIA.

FONTE: www.dnvision.com/taqman-genotyping-assays.php

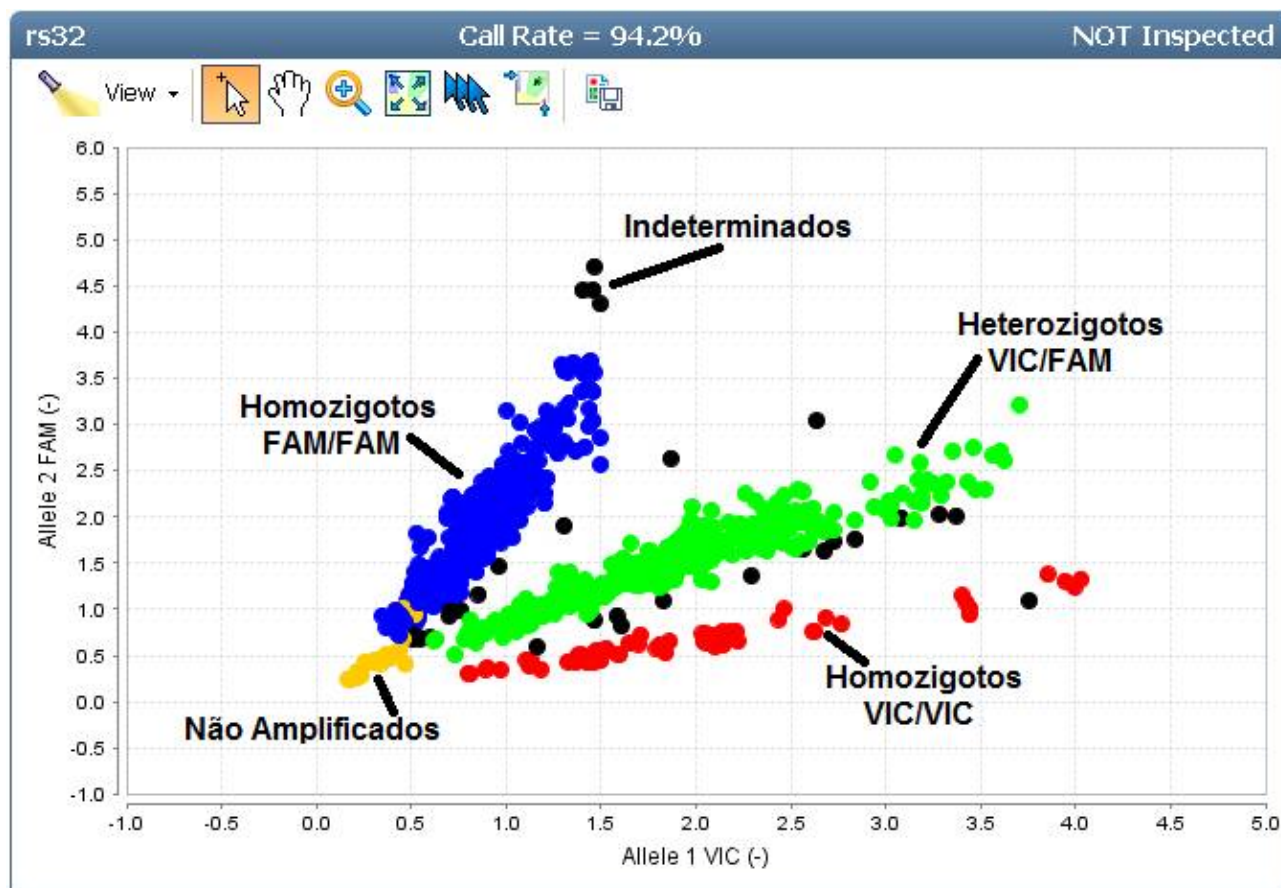


FIGURA 5 - EXEMPLO DE LEITURA DOS RESULTADOS DE GENOTIPAGEM COM TAQMAN.

FONTE: TaqMan Genotyper Software, modificado pelo autor (2014)

3.2.4 Análises dos dados

3.2.4.1 Frequências alélicas e genótípicas

As frequências alélicas e genótípicas foram obtidas através do programa R, utilizando o pacote Genetics (<http://cran.r-project.org/>).

O programa CLUMP (SHAM e CURTIS, 1995) foi usado para comparar as frequências alélicas e genótípicas dos casos e controles obtidas no presente trabalho com as de outros autores. O teste realizado pelo programa expressa o resultado da mesma maneira que o χ^2 . Neste programa, o nível de significância é primeiramente obtido dos dados reais e, em seguida, um grande número de tabelas (10.000, no presente estudo) com os mesmos totais marginais dos

dados reais é gerado por simulação de Monte Carlo, com base na hipótese nula de que populações diferentes possuem a mesma distribuição de frequência. O valor da estatística de cada tabela é calculado e uma estimativa empírica do valor de p que é a proporção de tabelas simuladas com uma estatística maior ou igual à obtida com os dados reais. A significância das diferenças se dá quando o valor de p é $\leq 0,05$.

3.2.4.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação, inferência haplotípica e teste de diferenciação.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado pelo programa R utilizando o pacote Genetics (<http://cran.r-project.org/>).

Teste de diferenciação entre os pares de amostras foi feito usando o programa Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010).

A distância genética usando as coordenadas geográficas dos centros como um dos parâmetros foi feita usando a função “Genetic Landscape Interpolation” pelo programa Alleles in Space (Miller, 2005).

O teste de normalidade pela metodologia de Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov), foi feito pelo programa R, pacote nortest (<http://cran.r-project.org/>).

Comparação de medianas foi feita pelo método de Mann Whitney, utilizando o programa R, pacote Stats (<http://cran.r-project.org/>).

4. Resultados

4.1 Análises das frequências dos SNPs dos genes IL-18 e IL-12B em pacientes com DM1 em diferentes regiões do Brasil.

As frequências alélicas e genotípicas dos SNPs g.-137G>C e g.-607C>A do gene *IL-18* e g.*159A>C do gene *IL-12B* em cada centro de coleta das amostras, estão listados na tabela 4 e nas figuras de 6-8.

As distribuições genotípicas de algumas amostras se mostraram não estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg (em negrito na tabela 4). Para o SNP g.-137G>C no centro de Brasília, para o g.-607C>A no centro HC-RS. Para o centro CEDEBA, a amostra se mostrou não estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os SNPs estudados.

Em relação às frequências alélicas para o rs187238 do gene *IL-18*, a predominância é do alelo G para todos os centros. Variando de 58.97% no centro de Bauru a 76.69% no centro CEDEBA. No caso das frequências genotípicas, 3 centros se destoam dos demais: O CEDEBA, Brasília e UFRJ. Nesses centros há mais genótipos GG, sempre acima dos 50% (Variando entre 53,15% a 63,51%). A comparação das frequências alélicas entre os centros de coleta demonstrou que elas são significativamente diferentes ($P < 0,0001$).

Em relação às frequências alélicas para o g.-607C>A do gene *IL-18*, a predominância é do alelo C para todos os centros. Variando de 50% no centro Curitiba a 64,62% no centro FMUSP seguido por 64,53% pelo centro CEDEBA. No caso das frequências genotípicas, todos os centros demonstram uma predominância para o genótipo CA, variando entre 37,70% no centro UNIFESP e 60,26% no centro CIDH, exceto FMUSP, onde o genótipo CC foi o mais frequente com 43,40% seguido por 42,45% para o genótipo CA. A comparação das frequências alélicas entre os centros de coleta demonstrou que elas são significativamente diferentes ($P < 0,0001$).

Em relação às frequências alélicas para o g.*159A>C do gene *IL-12B*, a predominância é do alelo A para todos os centros. Variando de 59,26% no centro de Belém a 80,08% no centro de Bauru. No caso das frequências

genotípicas, não há uma predominância de um genótipo em específico. 7 centros demonstram uma maior frequência do genótipo AA (variando de 40,74% do centro Belém a 62,71% no centro Bauru), enquanto que os outros 6 centros apresentam o genótipo AC como sendo a mais frequente (variando de 42,55% do centro CIDH a 57,14% do centro Curitiba). No caso do centro de Curitiba, não há nenhuma amostra com o genótipo CC. A comparação das frequências alélicas entre os centros de coleta demonstrou que elas são significativamente diferentes ($P < 0,0001$).

TABELA 4 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS SNPS G.-137G>C E G.-607C>A DO GENE *IL-18* E DO G. *159A>C DO GENE *IL-12B* NAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM DM1 POR CENTRO DE COLETA.

Centros		Bauru		UFRJ		UERJ		CIDH		Brasília	
	Alelos	1		2		3		4		5	
SNPs	Genótipos	n	f(%)	n	f(%)	N	f(%)	n	f(%)	n	f(%)
g.-137G>C <i>IL-18</i>	G	138	58.97	51	72.86	129	67.89	112	72.73	195	68.18
	C	96	41.03	19	27.14	61	32.11	42	27.27	91	31.82
	GG	45	38.46	20	57.14	42	44.21	39	50.65	76	53.15
	GC	48	41.03	11	31.43	45	47.37	34	44.16	43	30.07
	CC	24	20.51	4	11.43	8	8.42	4	5.19	24	16.78
HW	X ² (p)	2,7094 (0,1204)		1,4761 (0,2023)		0,7115 (0,3472)		0,9849 (0,3998)		13,4741 (0,0003)	
g.-607C>A <i>IL-18</i>	C	123	52.56	42	56.76	97	56.40	87	55.77	142	52.21
	A	111	47.44	32	43.24	75	43.60	69	44.23	130	47.79
	CC	32	27.35	13	35.14	27	31.40	20	25.64	40	29.41
	CA	59	50.43	16	43.24	43	50.00	47	60.26	62	45.59
	AA	26	22.22	8	21.62	16	18.60	11	14.10	34	25.00
HW	X ² (p)	0,0147 (0,8557)		0,5244 (0,523)		0,0238 (0,8246)		3,823 (0,051)		1,0166 (0,3911)	
g.*159A>C <i>3'UTR</i> <i>IL-12B</i>	A	189	80.08	49	70.00	138	73.40	56	59.57	195	70.65
	C	47	19.92	21	30.00	50	26.60	38	40.43	81	29.35
	AA	74	62.71	17	48.57	50	53.19	18	38.30	70	50.72
	AC	41	34.75	15	42.86	38	40.43	20	42.55	55	39.86
	CC	3	2.54	3	8.57	6	6.38	9	19.15	13	9.42
HW	X ² (p)	0,9404 (0,2446)		0,0146 (1)		0,1175 (0,7919)		0,6383 (0,5531)		0,2092 (0,6759)	

Nota: HW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Centros		FMUSP		Belém		HC-RS		Ceara		CEDEBA	
SNPs	Alelos	6		7		8		9		10	
	Genótipos	n	f(%)	n	f(%)	N	f(%)	n	f(%)	n	f(%)
g.-137G>C	G	145	64.16	44	61.11	154	66.96	48	66.67	227	76.69
	C	81	35.84	28	38.89	76	33.04	24	33.33	69	23.31
IL-18	GG	48	42.48	13	36.11	51	44.35	15	41.67	94	63.51
	GC	49	43.36	18	50.00	52	45.22	18	50.00	39	26.35
	CC	16	14.16	5	13.89	12	10.43	3	8.33	15	10.14
	HW	X ² (p)		0,3688 (0,542)		0,0971 (1)		0,055 (0,8364)		0,5625 (0,7089)	
g.-607C>A	C	137	64.62	39	52.70	155	53.45	53	58.89	191	64.53
	A	75	35.38	35	47.30	135	46.55	37	41.11	105	35.47
IL-18	CC	46	43.40	11	29.73	49	33.79	14	31.11	54	36.49
	CA	45	42.45	17	45.95	57	39.31	25	55.56	83	56.08
	AA	15	14.15	9	24.32	39	26.90	6	13.33	11	7.43
	HW	X ² (p)		0,5424 (0,5198)		0,2274 (0,7372)		6,3967 (0,0122)		0,9774 (0,3605)	
g.*159A>C	A	188	68.12	32	59.26	195	68.66	57	66.28	200	67.57
	C	88	31.88	22	40.74	89	31.34	29	33.72	96	32.43
IL-12B	AA	62	44.93	11	40.74	64	45.07	21	48.84	59	39.86
	AC	64	46.38	10	37.04	67	47.18	15	34.88	82	55.41
	CC	12	8.70	6	22.22	11	7.75	7	16.28	7	4.73
	HW	X ² (p)		0,6325 (0,4369)		1,4652 (0,2578)		1,3196 (0,2511)		2,0737 (0,165)	
		0,6325 (0,4369)		1,4652 (0,2578)		1,3196 (0,2511)		2,0737 (0,165)		10,328 (0,00089)	

Nota: HW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Centros		Curitiba		UNIFESP		Campinas	
SNPs	Alelos	11		12		13	
	Genótipos	n	f(%)	n	f(%)	N	f(%)
g.-137G>C	G	72	63.16	78	65.00	93	67.39
	C	42	36.84	42	35.00	45	32.61
IL-18	GG	23	40.35	28	46.67	29	42.03
	GC	26	45.61	22	36.67	35	50.72
	CC	8	14.04	10	16.67	5	7.25
HW	X ² (p)	0,0224 (1)		2,2614 (0,1631)		1,639 (0,1645)	
g.-607C>A	C	50	50.00	63	51.64	74	52.86
	A	50	50.00	59	48.36	66	47.14
IL-18	CC	11	22.00	20	32.79	21	30.00
	CA	28	56.00	23	37.70	32	45.71
	AA	11	22.00	18	29.51	17	24.29
HW	X ² (p)	0,72 (0,5759)		3,6642 (0,06989)		0,479 (0,6315)	
g.*159A>C 3'UTR	A	10	71.43	80	66.67	109	76.76
	C	4	28.57	40	33.33	33	23.24
IL-12B	AA	3	42.86	24	40.00	41	57.75
	AC	4	57.14	32	53.33	27	38.03
	CC	0	0.00	4	6.67	3	4.23
HW	X ² (p)	1,12 (0,5211)		2,4 (0,1592)		0,3082 (0,4951)	

Nota: HW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

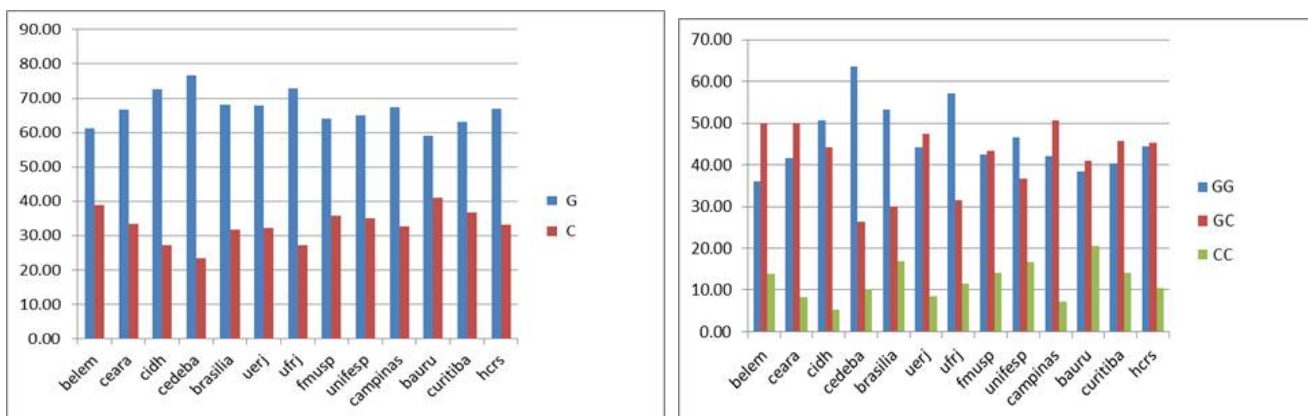


FIGURA 6 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (À ESQUERDA) E GENOTÍPICAS (À DIREITA) DO SNP G.-137G>C DO GENE *IL-18* NOS DIFERENTES CENTROS DE COLETA.

FONTE: Autor (2014)

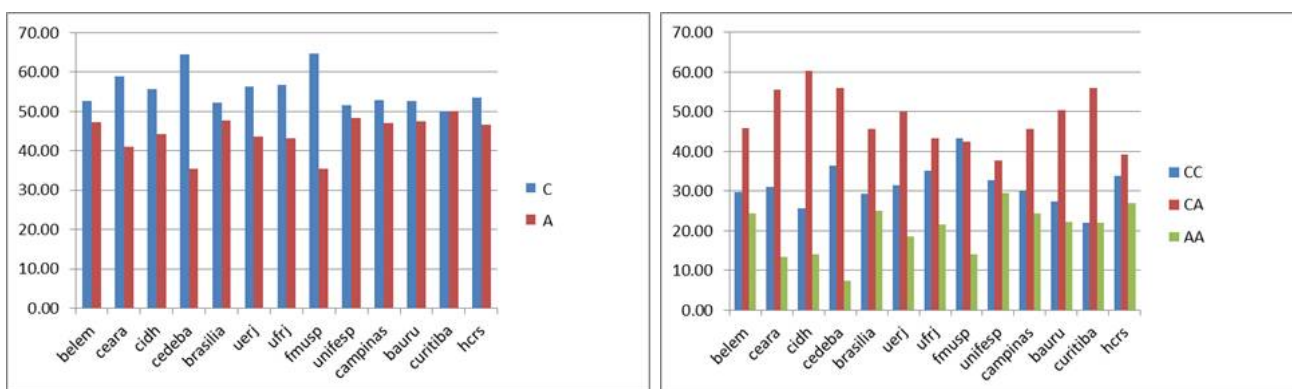


FIGURA 7 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (À ESQUERDA) E GENOTÍPICAS (À DIREITA) DO SNP g.-607C>A DO GENE *IL-18* NOS DIFERENTES CENTROS DE COLETA.

FONTE: Autor (2014)

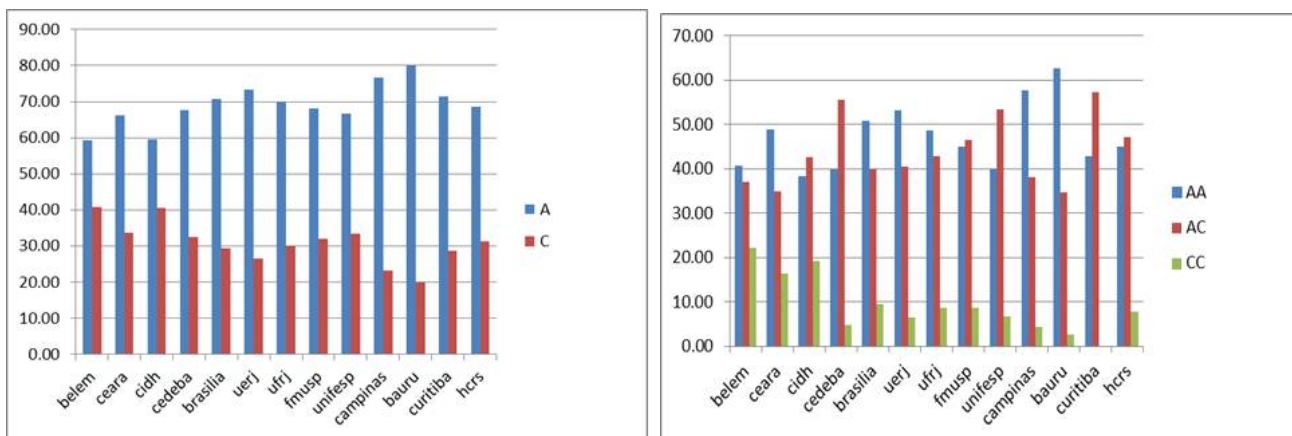


FIGURA 8 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (À ESQUERDA) E GENOTÍPICAS (À DIREITA) DO SNP G.*159A>C DO GENE *IL-12B* NOS DIFERENTES CENTROS DE COLETA.

FONTE: Autor (2014)

4.2 Diferenciação das amostras entre os centros.

Os resultados do Teste exato da diferenciação entre amostras de cada centro, baseadas em frequências genotípicas, estão na tabela 5. O centro UFRJ demonstrou ser o mais semelhante em comparação com as amostras dos outros centros, sendo este centro semelhante com 10 centros e somente diferente em comparação com os outros 2 (CIDH e Curitiba). Enquanto que o centro Curitiba, no extremo oposto, é o mais divergente dentre todos os centros, não sendo semelhante a nenhum outro centro.

Essas diferenças entre os centros também podem ser vistas de forma gráfica nas figuras 9 a 11, respectivamente, utilizando os dados dos três SNPs, utilizando os dados dos 2 SNPs do gene *IL-18* e utilizando os dados do SNP do gene *IL-12B*.

TABELA 5 - TESTE EXATO DA DIFERENCIAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DE CADA CENTRO BASEADAS EM FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS.

	UERJ	UFRJ	UNIFESP	FMUSP	Campinas	Bauru	HC-RS	Curitiba	Belém	Ceará	CIDH	CEDEBA	Brasília
UERJ	=====	0.20471	0.00152	0.00205	0.00261	0.00054	0.00020	0.00000	0.12862	0.05262	0.00001	0.00001	0.00000
UFRJ	-	=====	0.11659	0.20108	0.15980	0.36530	0.18899	0.00000	0.05829	0.73408	0.01672	0.05398	0.13332
UNIFESP	+	-	=====	0.00595	0.02295	0.02352	0.10807	0.00000	0.04371	0.06351	0.00000	0.00170	0.02334
FMUSP	+	-	+	=====	0.00107	0.00004	0.00200	0.00000	0.00336	0.08145	0.00000	0.00000	0.00000
Campinas	+	-	+	+	=====	0.76198	0.10210	0.00000	0.00249	0.32513	0.00000	0.00009	0.00713
Bauru	+	-	+	+	-	=====	0.00018	0.00000	0.00000	0.06639	0.00000	0.00000	0.00171
HC-RS	+	-	-	+	-	+	=====	0.00000	0.00255	0.13073	0.00000	0.00000	0.00000
Curitiba	+	+	+	+	+	+	+	=====	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Belém	-	-	+	+	+	+	+	+	=====	0.30404	0.32683	0.00160	0.00085
Ceará	-	-	-	-	-	-	-	+	-	=====	0.03900	0.00728	0.00166
CIDH	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	=====	0.00000	0.00000
CEDEBA	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	=====	0.00008
Brasília	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	=====

Nota: Na parte inferior, o símbolo “+” representa as diferenças significativas entre centros (nível significativo = 0,05) e na parte superior com todos os valores de p (em negrito os valores significativos).

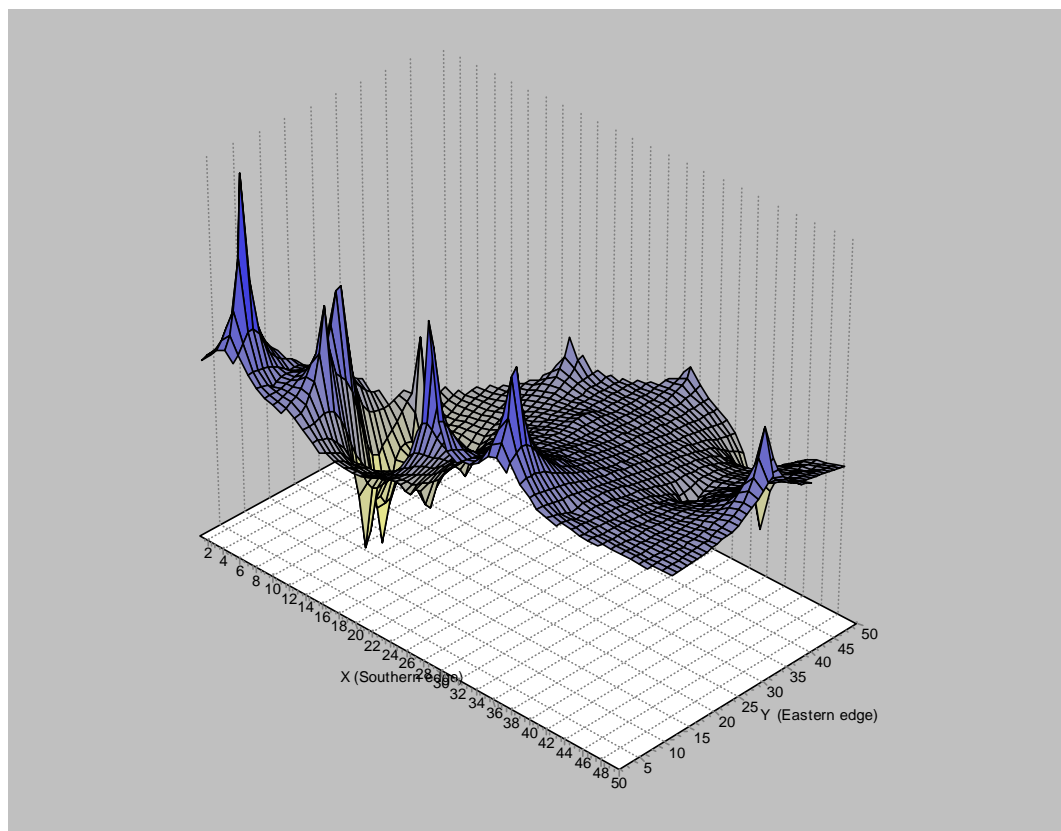


FIGURA 9 - DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE OS CENTROS (EIXO Z), UTILIZANDO OS DADOS DOS TRÊS SNPS, SENDO QUE OS EIXOS X E Y CORRESPONDEM ÀS COORDENADAS GEOGRÁFICAS.

FONTE: Programa alleles in space, modificado pelo autor (2014)

Nota: Para calcular as distâncias genéticas foram usadas de forma idêntica ao que se faz com dados de frequências de populações (Nei *et al.*, 1983), só que nesse caso é entre pares de indivíduos. As coordenadas geográficas utilizadas estão no apêndice 2.

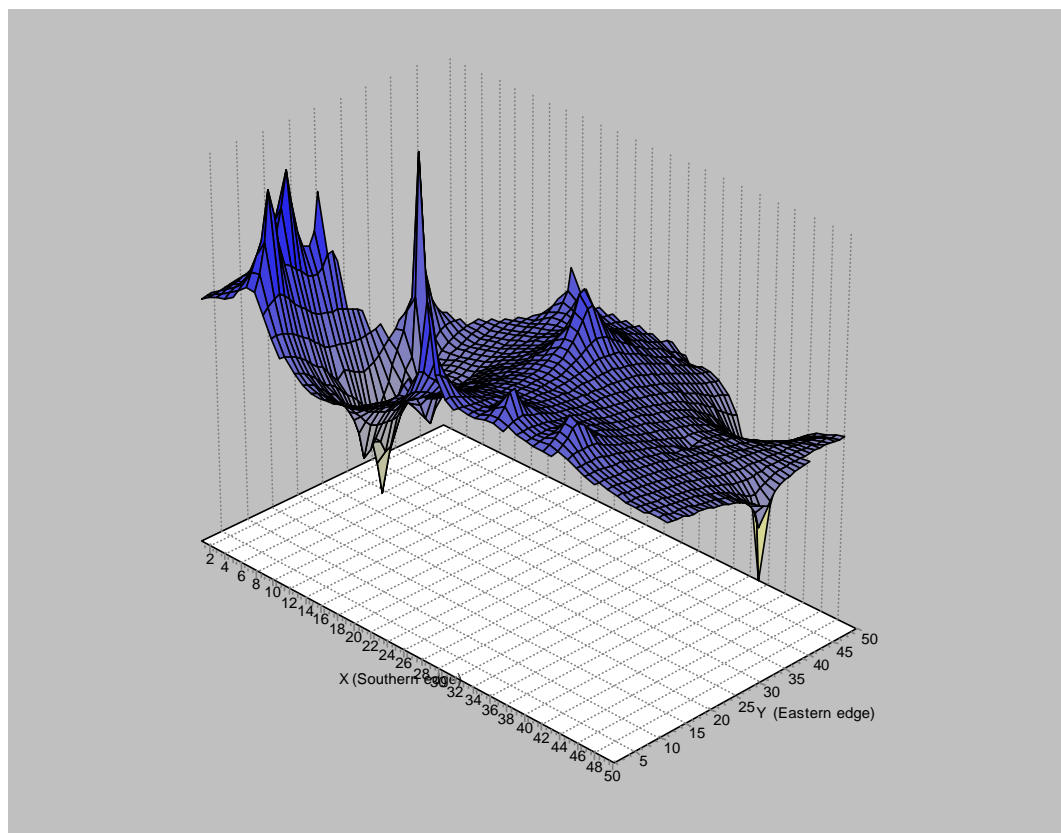


FIGURA 10 - DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE OS CENTROS (EIXO Z), UTILIZANDO OS DADOS DOS 2 SNPS DO GENE *IL-18*, SENDO QUE OS EIXOS X E Y CORRESPONDEM ÀS COORDENADAS GEOGRÁFICAS.

FONTE: Programa alleles in space, modificado pelo autor (2014)

Nota: Para calcular as distâncias genéticas foram usadas de forma idêntica ao que se faz com dados de frequências de populações (Nei *et al.*, 1983), só que nesse caso é entre pares de indivíduos. As coordenadas geográficas utilizadas estão no apêndice 2.

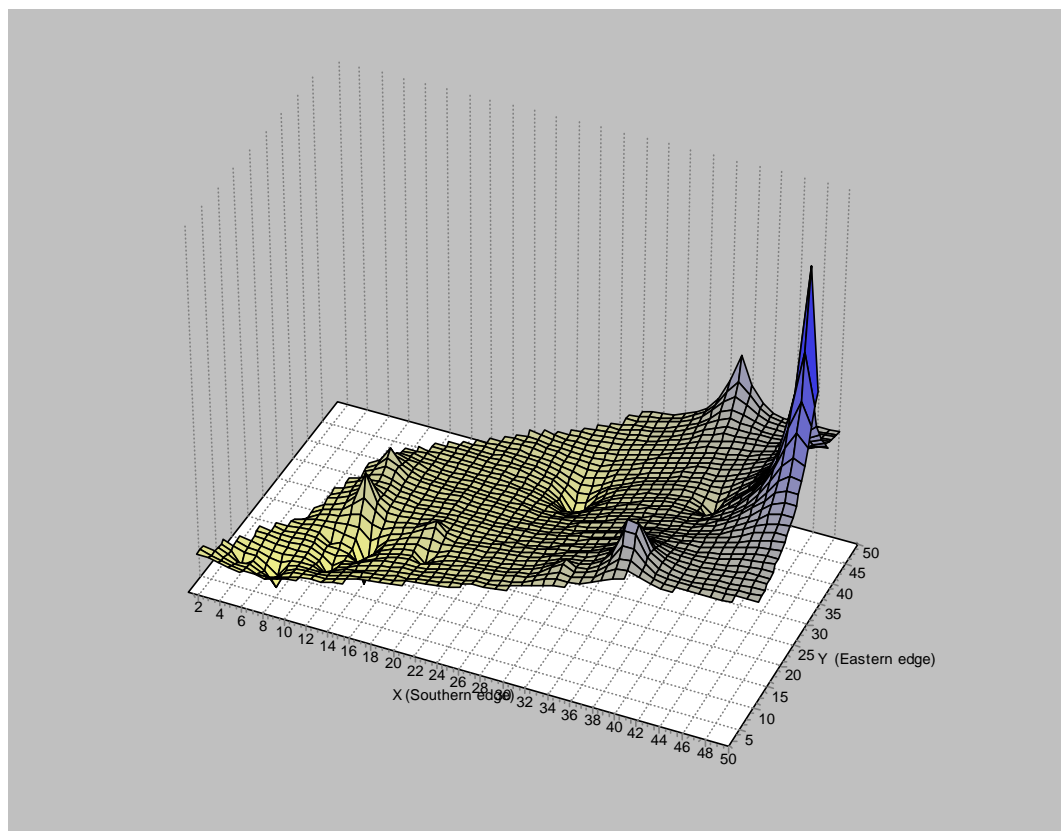


FIGURA 11 - DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE OS CENTROS (EIXO Z), UTILIZANDO OS DADOS DO SNPS DO GENE *IL-12B*, SENDO QUE OS EIXOS X E Y CORRESPONDEM ÀS COORDENADAS GEOGRÁFICAS.

FONTE: Programa alleles in space, modificado pelo autor (2014)

Nota: Para calcular as distâncias genéticas foram usadas de forma idêntica ao que se faz com dados de frequências de populações (Nei *et al.*, 1983), só que nesse caso é entre pares de indivíduos. As coordenadas geográficas utilizadas estão no apêndice 2.

Foi feito o teste de normalidade de Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) para as idades de diagnóstico na amostra total. O teste mostrou que os dados de DM1 apresentam uma distribuição que não é normal com valor de $p < 2.2e-16$. Um gráfico foi confeccionado com os dados analisados mostrando a distribuição das idades nos centros em formato de histograma e uma linha azul que mostra o padrão esperado caso a distribuição fosse normal (figura 12).

Os mínimos e máximos das idades de diagnóstico, as médias e medianas (estatística descritiva) em cada centro estão explicitadas na tabela 6.

As comparações das medianas das idades de diagnóstico entre os centros estão na tabela 7. Entre os centros analisados, Curitiba mostrou ser o centro com a mediana mais semelhante aos outros centros, seguido do centro de Bauru. Enquanto que o menos semelhante foi o centro de Campinas, com nenhuma semelhança com os outros centros.

Pelo gráfico de Boxplot, a distribuição das idades atuais dos pacientes em meses por centro está na figura 13.

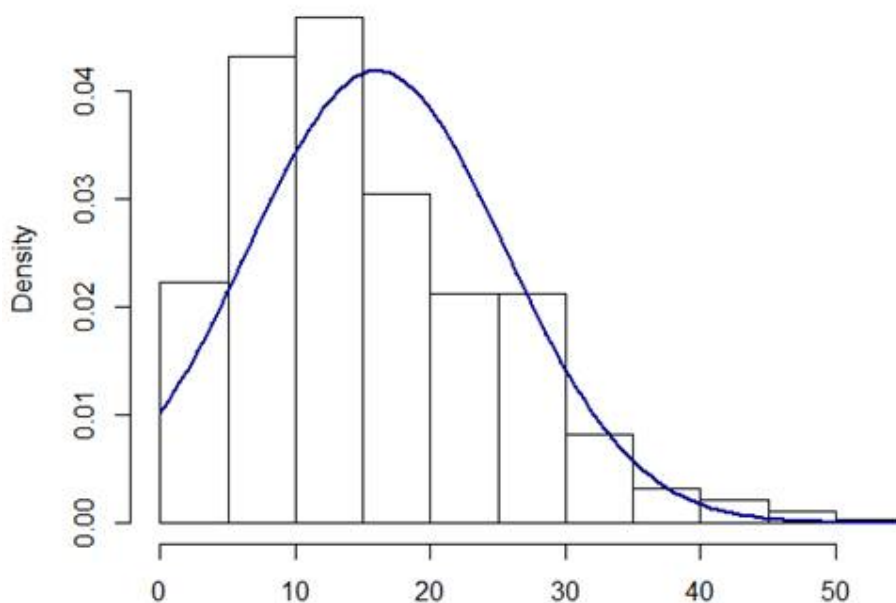


FIGURA 12 - PADRÃO OBSERVADO DE DISTRIBUIÇÃO DAS IDADES DE DIAGNÓSTICO NOS CENTROS (HISTOGRAMA) E A DISTRIBUIÇÃO ESPERADA, CASO FOSSE UMA DISTRIBUIÇÃO NORMAL (LINHA AZUL).

FONTE: Autor (2014)

TABELA 6. ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS IDADES DE DIAGNÓSTICO EM CADA CENTRO.

Idades Centros	Mínimo	1º Q	Mediana	Média	3º Q	Máximo	NA
Bauru	1	8	12	14,15	19	46	0
UERJ	1	10	14	17,33	25	41	11
Brasília	1	10	15	15,78	20	40	2
HC-RS	0	8,25	17	18	27	55	7
Ceara	4	9	14	15,38	20	34	1
CEDEBA	1	10	15,5	15,95	22	38	28
Curitiba	2	8,75	11,50	13,52	16,25	49	9
Campinas	1	8	13,50	16,59	21,50	50	24

NOTAS: Q = quartil, NA = sem informação

Até a presente data, não tínhamos as informações dos outros centros.

TABELA 7 - COMPARAÇÕES DAS MEDIANAS DE IDADES DE DIAGNÓSTICO DOS CENTROS.

	UERJ	Campinas	Bauru	HC-RS	Curitiba	Ceara	CEDEBA	Brasília
UERJ	=====	0.3566	0,01036	0.8416	0.02516	0.2587	0.5285	0.4566
Campinas	+	=====	0.3104	0.4027	0.322	0.941	0.6069	0.6681
Bauru	-	+	=====	0.008448	0.9146	0.2396	0.01777	0,02759
HC-RS	+	+	-	=====	0.02101	0.281	0.307	0.2226
Curitiba	-	+	+	-	=====	0.2725	0.02736	0.0374
Ceara	+	+	+	+	+	=====	0.5318	0.5714
CEDEBA	+	+	-	+	-	+	=====	0.7383
Brasília	+	+	+	+	-	+	+	=====

Nota: Na parte inferior, o símbolo “+” representa as diferenças significativas entre centros. (Medianas diferentes; $p > 0,05$) e na parte superior com todos os valores de p (em negrito os valores significativos).

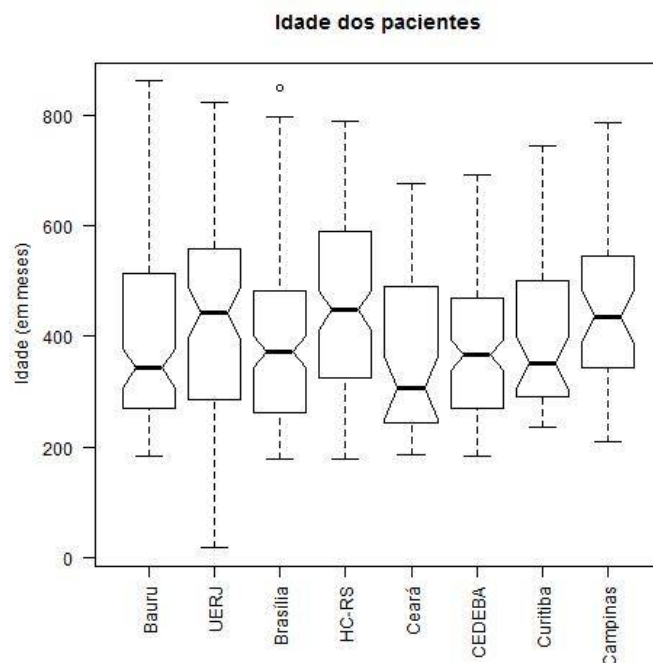


FIGURA 13 - DISTRIBUIÇÃO DAS IDADES ATUAIS (EM MESES) DOS PACIENTES EM MESES POR CENTRO.

FONTE: Autor (2014)

NOTA: Para explicação detalhada sobre o boxplot ver apêndice 3.

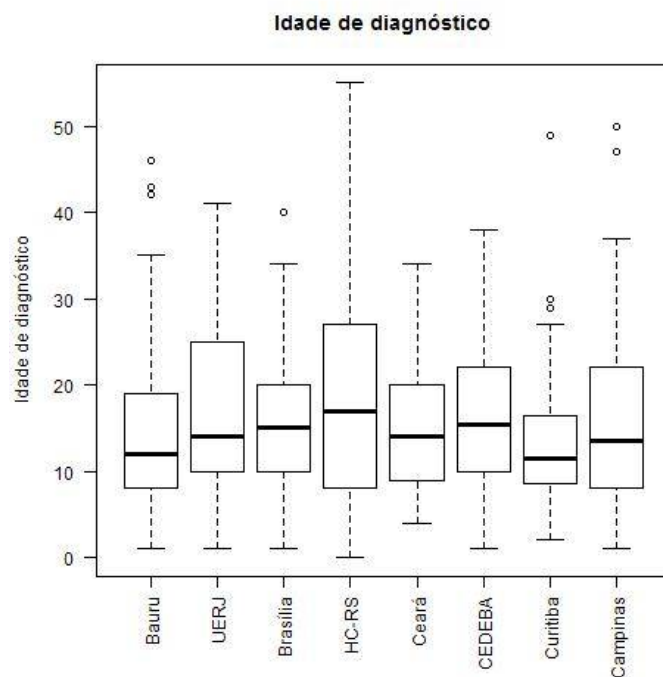
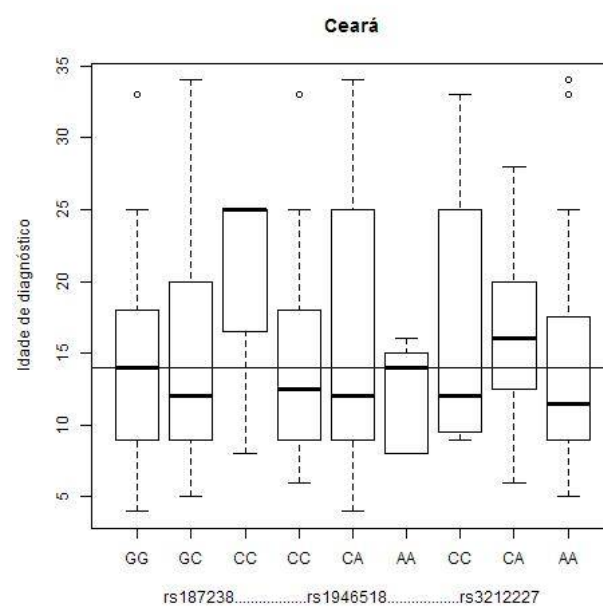
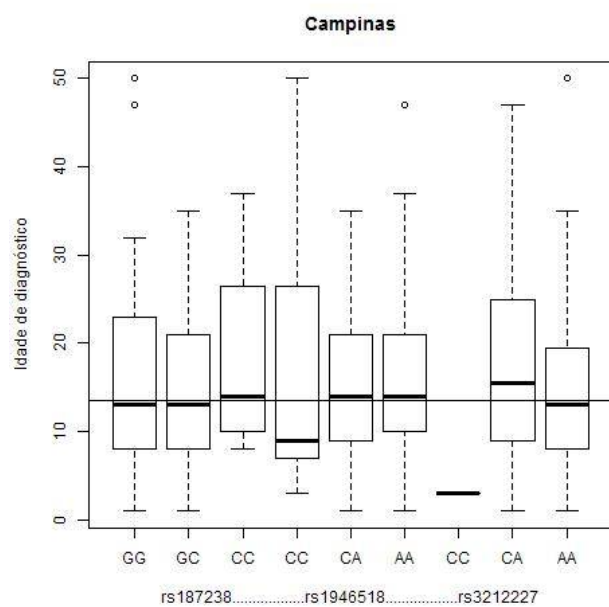
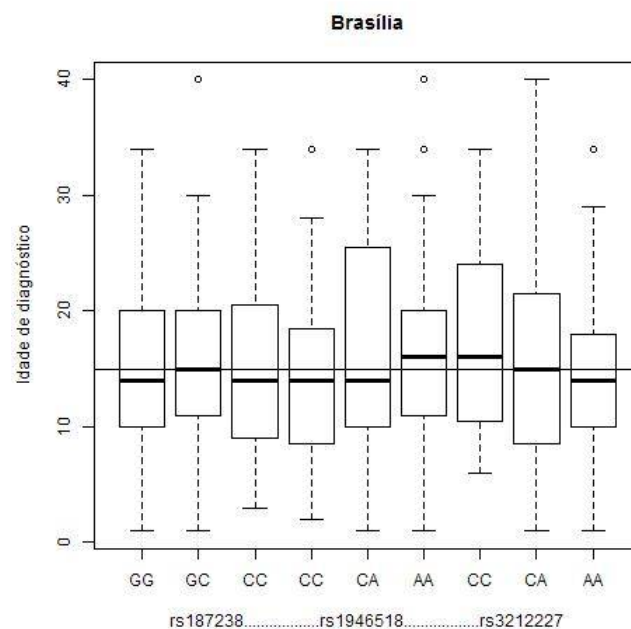
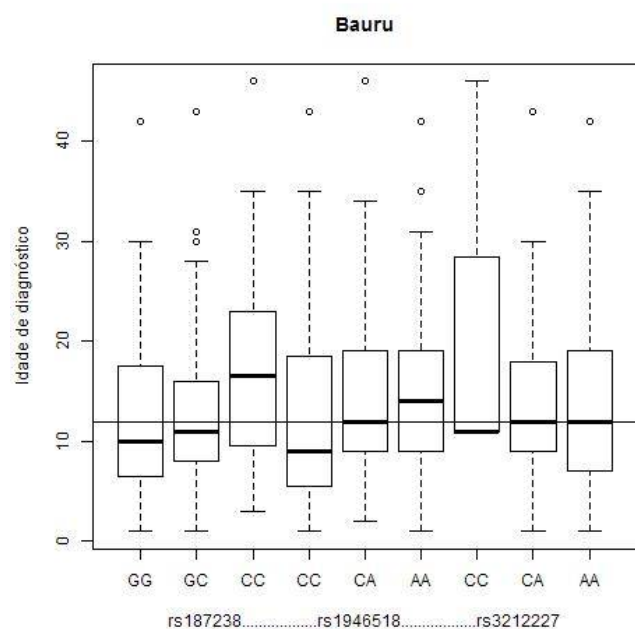


FIGURA 14 - DADOS DA IDADE (EM ANOS) DE DIAGNÓSTICO DE DM1 DOS PACIENTES EM CADA CENTRO DE COLETA.

FONTE: Autor (2014)

4.3 Genes *IL-18* e *IL-12B* e idade de diagnóstico do DM1.

Os dados da idade de diagnóstico de DM1 dos pacientes em cada centro de coleta são vistos na tabela 6 e graficamente na figura 14 (os resultados da comparação entre os centros podem ser vistos na tabela 7). A idade de diagnóstico de DM1 foi comparada com cada um dos genótipos dos SNPs g.-137G>C e g.-607C>A do gene *IL-18* e g.*159A>C do gene *IL-12B* em cada centro de coleta (figuras 15). As linhas horizontais representando a mediana do centro.



Continua

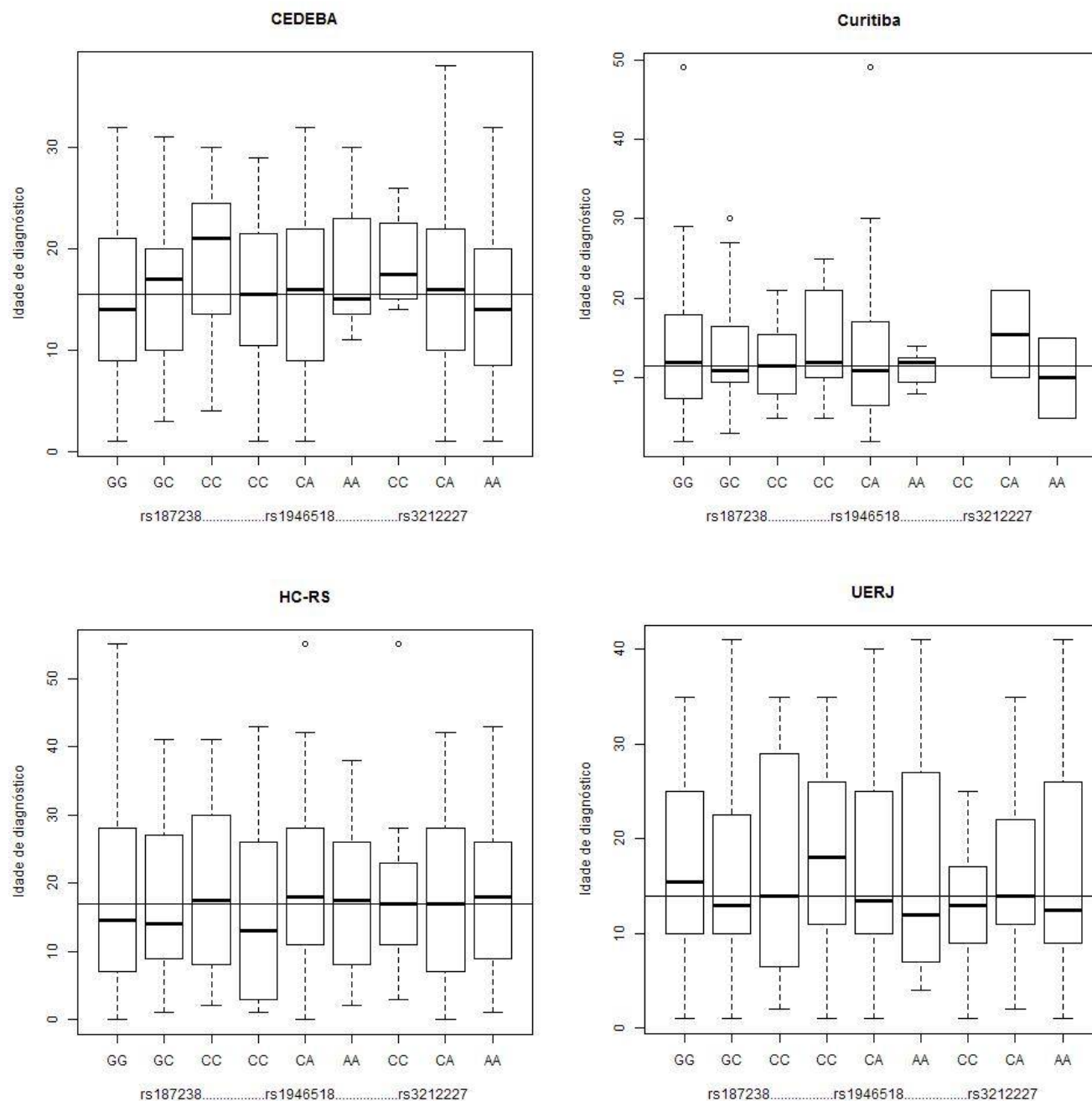


FIGURA 15 - IDADE DE DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM DM1 DOS CENTROS NA AMOSTRA ESTRATIFICADA PELOS GENÓTIPOS DOS SNPS G.-137G>C (RS187238) E G.-607C>A (RS1946518) DO GENE *IL-18* E G.*159A>C (rs3212227) DO GENE *IL-12B*.

FONTE: O autor (2014)

Comparação das medianas da idade de diagnóstico pelo teste de Mann-Whitney dos genótipos dos alelos usuais contra os outros estão na tabela 8.

TABELA 8. COMPARAÇÃO DAS MEDIANAS, ATRAVÉS DO TESTE DE MANN WHITNEY, ENTRE OS GENÓTIPOS:

Centros	Medianas	<i>IL-18</i> g.-137G>C GG e GC vs CC	<i>IL-18</i> g.-607C>A CA e AA vs CC	<i>IL-12B</i> G.*159A>C , 3'UTR CA e AA vs CC
Bauru	12	p=0.04955	p=0.1003	p=0.4384
UERJ	14	p=0.8367	p=0.4703	p=0.4931
Brasília	15	p=0.8515	p=0.436	p=0.5533
HC-RS	17	p=0.5706	p=0.05335	p=0.8721
Ceará	14	p=0.4776	p=0.5635	p=0.6356
CEDEBA	15,50	p=0.2164	p=0.975	p=0.3571
Curitiba	11,50	p=0.8244	p=0.5994	

Nota: Os genótipos foram agrupados de acordo com os padrões observados na figura 15. Não foi possível executar esse teste para o centro Campinas porque o N não foi suficiente.

Na tabela 9 estão os grupos de genótipos, citados na figura 16, explicitando aqueles que demonstram uma tendência a apresentar diferença significativa quando observada a mediana da idade de diagnóstico em negrito.

Os grupos de genótipos são todas as possíveis combinações de genótipos a partir dos 3 SNPs estudados. Sendo 3 genótipos possíveis para cada SNP totalizando ao todo uma combinação de 27 genótipos diferentes.

A idade de diagnóstico de DM1 foi comparada com grupos de genótipos compostos pelos SNPs g.-137G>C e g.-607C>A do gene *IL-18* e g.*159A>C do gene *IL-12B* em cada um dos centros (figuras 16).

As comparações das medianas através do teste de Mann Whitney dos grupos de genótipos, usando-se os SNPs g.-137G>C e g.-607C>A do gene *IL-18*, baseando em uma tendência de padrão recorrente entre centros estão na tabela 10.

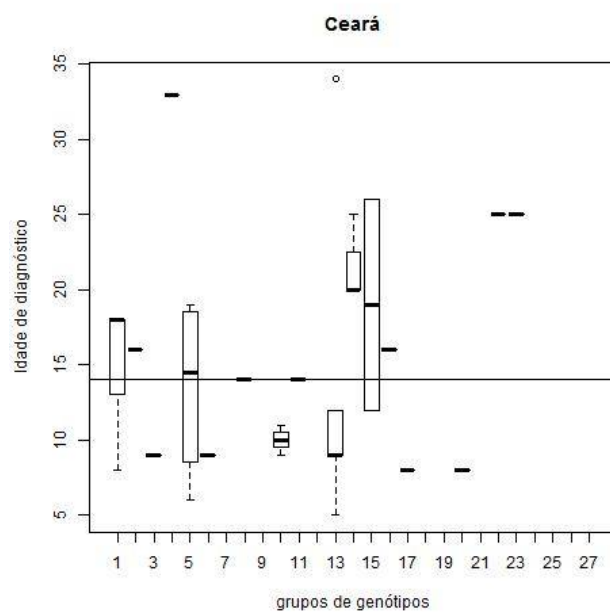
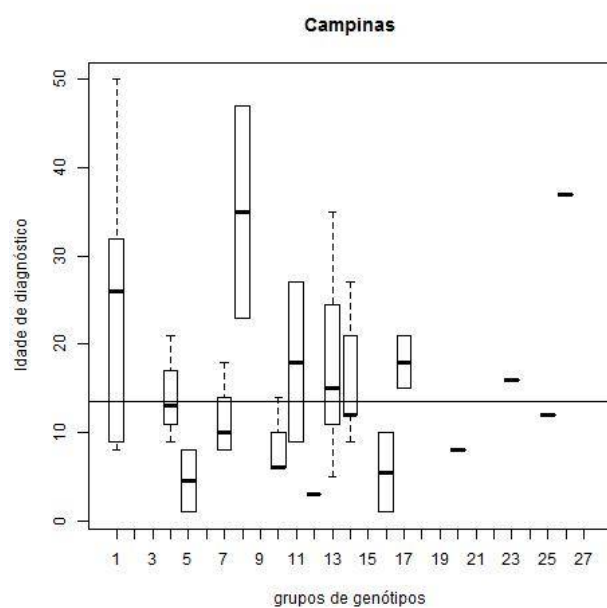
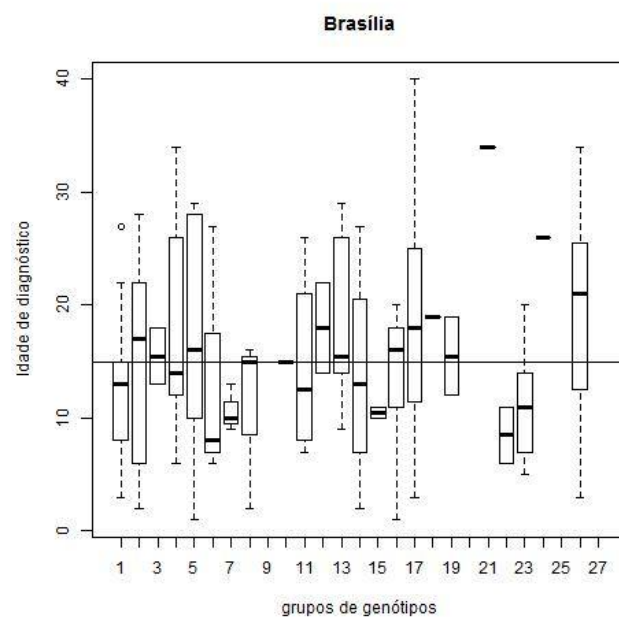
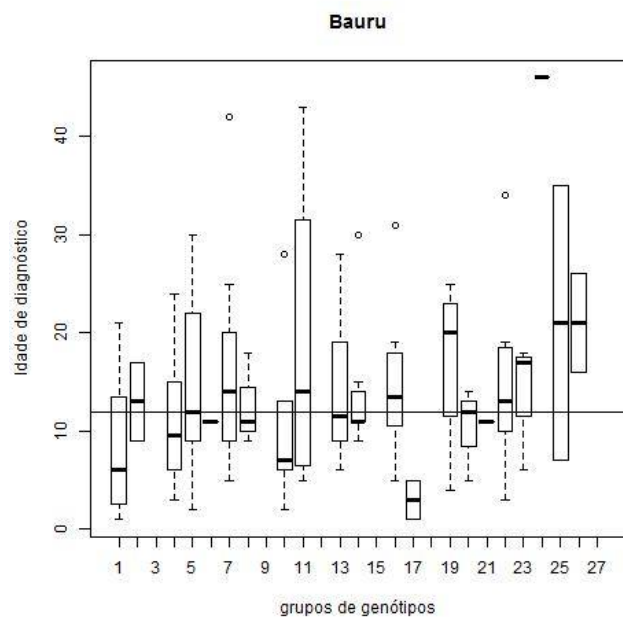
TABELA 9 - ANÁLISE DOS GRUPOS DE GENÓTIPOS COMPOSTOS PELOS SNPS G.-137G>C E G.-607C>A DO GENE *IL-18* E G.*159A>C DO GENE *IL-12B*, CITADAS NOS GRÁFICOS DA FIGURA 16, EXPLICITANDO AQUELES QUE DEMONSTRAM UMA TENDÊNCIA A APRESENTAR DIFERENÇA SIGNIFICATIVA QUANDO OBSERVADA A MEDIANA DA IDADE DE DIAGNÓSTICO.

Grupos	Genótipos	Bauru	Brasília	Campinas	Ceará	CEDEBA	HCRS	UERJ
1	GG;CC;AA	-/-	-	+/+	+/+	-/-	+	+/+
2	GG;CC;AC	+	+				-/-	+/+
3	GG;CC;CC		+					
4	GG;CA;AA	-	-	-		-	-	-/-
5	GG;CA;AC		+	-/-	+	-/-	-/-	
6	GG;CA;CC	-	-/-			+	-	-
7	GG;AA;AA	+	-/-	-			-/-	
8	GG;AA;AC	-		+/+		-		
9	GG;AA;CC						+/+	
10	GC;CC;AA	-/-		-/-	-/-	-	-/-	
11	GC;CC;AC	+	-	+/+		-	+/+	-
12	GC;CC;CC		+					
13	GC;CA;AA	-	+	+	-/-	+	+/+	-
14	GC;CA;AC	-	-	-	+/+	+	-/-	
15	GC;CA;CC		-/-		+/+			-
16	GC;AA;AA	+	+	-/-		-		-
17	GC;AA;AC	-/-	+	+/+			+/+	
18	GC;AA;CC							
19	CC;CC;AA	+/+	+					
20	CC;CC;AC					-/-		
21	CC;CC;CC	-						
22	CC;CA;AA	+	-/-					
23	CC;CA;AC	+/+	-/-			+/+	+/+	
24	CC;CA;CC							
25	CC;AA;AA	+/+					-	+/+
26	CC;AA;AC	+/+	+/+			+/+		
27	CC;AA;CC							

NOTA: + = acima da mediana; +/+ = muito acima da mediana

- = abaixo da mediana; -/- = muito abaixo da mediana

O “acima” ou “abaixo” é determinado quando a diferença entre as medianas do centro com a mediana geral for de até 5 anos. Enquanto o “muito acima” ou “muito abaixo” é determinado quando a diferença entre as medianas do centro com a mediana geral excede 5 anos.



Continua

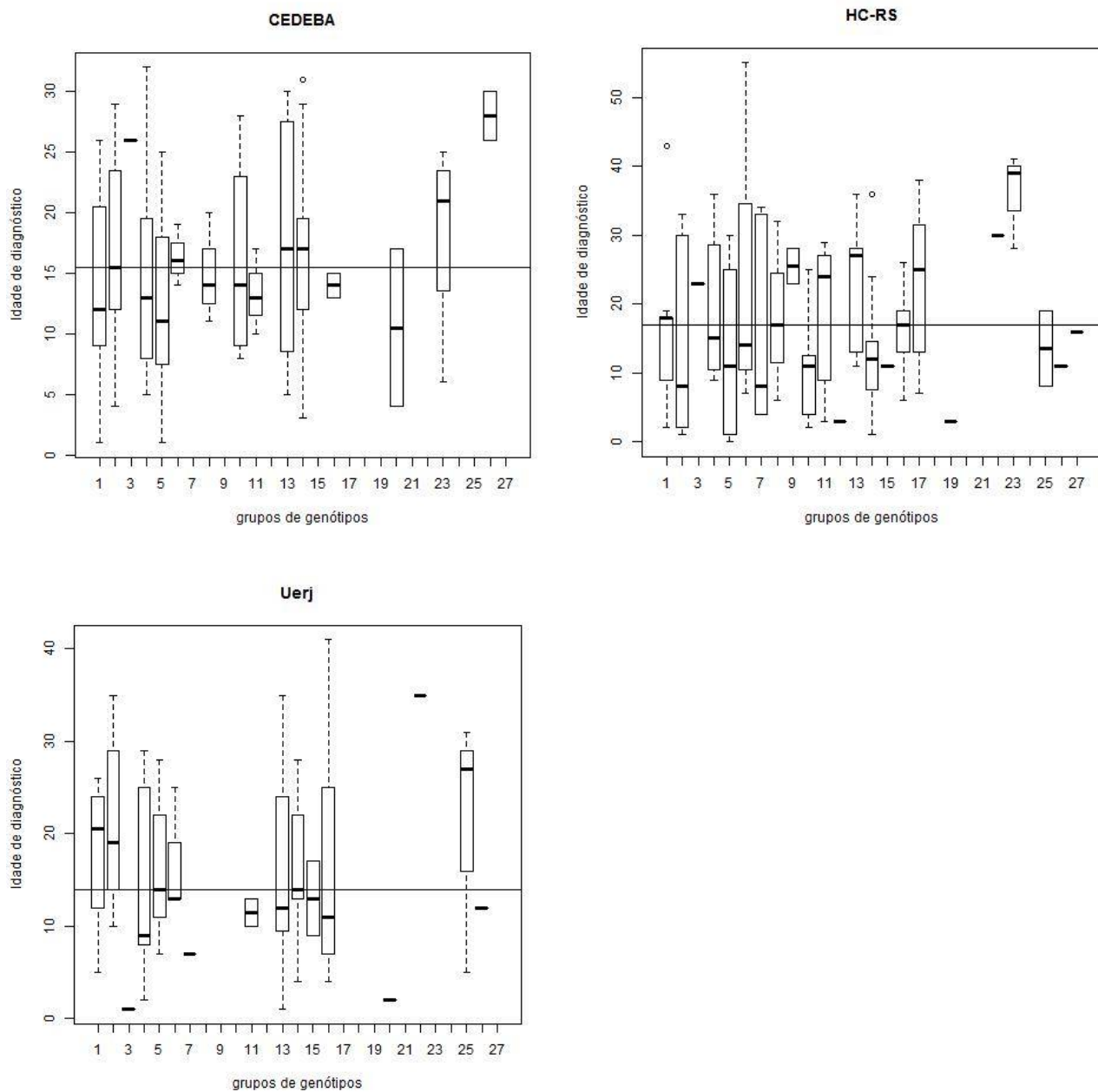


FIGURA 16 - BOXPLOT COMPARANDO A IDADE DE DIAGNÓSTICO DE DM1 COM GRUPOS DE GENÓTIPOS COMPOSTOS PELOS SNPS G.-137G>C E G.-607C>A DO GENE *IL-18* E G.*159A>C DO GENE *IL-12B* NOS DIFERENTES CENTROS

NOTA: O autor (2014)

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DAS MEDIANAS ATRAVÉS DO TESTE DE MANN WHITNEY DOS GRUPOS DE GENÓTIPOS, USANDO-SE OS GENÓTIPOS DOS SNPS G.-137G>C (GG E GC) E G.-607C>A (CC) DO GENE *IL-18* CONTRA O RESTO, BASEANDO EM UMA TENDÊNCIA DE PADRÃO RECORRENTE ENTRE CENTROS.

Centros	Medianas	g.-137G>C (GG e GC) g.-607C>A (CC) vs Outros agrupamentos
Bauru	12	p = 0.08773
UERJ	14	p = 0.2761
Brasília	15	p = 0.6547
HC-RS	17	p = 0.09349
Ceará	14	p = 0.06889
CEDEBA	15,50	p = 0.06619
Campinas	13,50	p = 0.2717

Nota: Não foi possível executar esse teste para o centro Curitiba porque o N não foi suficiente

5. Discussão

5.1 Análises das frequências dos SNPs dos genes *IL-18* e *IL-12B* em pacientes com DM1 em diferentes regiões do Brasil.

Esse projeto conjunto possibilitou conseguir um grande número de pacientes com DM1. Essa estratégia foi eficiente, pois resultou em mais de 1200 amostras, no entanto, como podemos ver nas tabelas 4 e 5, existem diferenças nas frequências alélicas e genotípicas entre os diferentes centros de coletas das amostras de pacientes com DM1. Esse resultado mostra a necessidade de cautela na análise desses dados. Não é possível simplesmente reunir essas amostras. Como ainda não foram processadas as informações dos pacientes, ainda não é possível aprofundar a análise dessas diferenças, pois temos duas fontes de heterogeneidade. A primeira delas é a composição étnica das amostras, pois temos amostras de diferentes regiões do Brasil, que sabidamente tem composições de ancestralidade étnicas afrodescendentes, eurodescendentes e ameríndias diferentes (Pena *et al.*, 2011). O outro aspecto é que podem existir diferenças em relação à própria doença entre os centros. Embora os critérios de diagnóstico e inclusão devessem ser os mesmos entre os diferentes centros, como são equipes e realidades diferentes, isso pode levar a uma heterogeneidade no grupo com DM1. Se o segundo caso for verdadeiro, os polimorfismos analisados podem estar relacionados com esse aspecto do DM1 que está diferindo entre os centros.

O desequilíbrio de Hardy-Weinberg dos SNPs em alguns centros também reforça a participação destes na doença, mas também mostra a heterogeneidade entre os centros. O SNP g.-137G>C do gene *IL-18* não está em equilíbrio na amostra de Brasília e da Bahia (CEDEBA), em ambos, há uma falta de heterozigotos. Por outro lado, o g.-607C>A deste mesmo gene na amostra do Rio Grande do Sul e da Bahia (CEDEBA) fogem do equilíbrio de Hardy-Weinberg por motivos diferentes. Enquanto que na amostra do Rio Grande do Sul apresenta uma perda de heterozigotos com um ganho de homozigotos dos alelos não-usuais, nivelando as frequências dos genótipos para uma divisão igualitária (1/3,1/3,1/3), no caso da amostra da Bahia há uma perda de homozigotos recessivos. E finalmente, o g.*159A>C do gene *IL-12B*

não está em equilíbrio na amostra da Bahia (CEDEBA), sendo que há um excesso de heterozigotos.

Os alelos g.-137C e g.-607A são conhecidos por infraregular a expressão do gene *IL-18* ao nível da transcrição por bloquear elementos de transcrição na região promotora do gene (Giedraitis *et al.*, 2001). Essa regulação por sua vez pode influenciar a diminuição da produção de INF- γ (Tavares *et al.*, 2013), que em níveis mais altos foi associado com uma predominância da resposta dos linfócitos Th1 (Nicoletti *et al.*, 2001) que é um dos responsáveis junto aos linfócitos Th2 por infiltrar nas ilhotas pancreáticas seguida da destruição das células beta, podendo levar ao início da diabetes (Cebeci *et al.*, 2006; Rachmiel *et al.*, 2006).

Muitos estudos corroboram que o aumento dos níveis plasmáticos de IL-18 estão associados com a susceptibilidade ao DM1 em estágios pré-clínicos e envolvidos com a sua progressão (Nicoletti *et al.*, 2001; Rachmiel *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 2013). No estudo de Tavares (2013), em uma população do nordeste do Brasil, os alelos g.-137G e genótipos g.-137GG foram associadas com a susceptibilidade com DM1. Além da combinação de alelos g.-607C/g.-137G estar mais frequente entre pacientes sugerindo a hipótese de um menor nível de IL-18 ter um efeito de proteção contra o aparecimento do DM1. Resultados confirmados também em população Han Chinesa (Dong *et al.*, 2007) e outra da população japonesa (Ide *et al.*, 2004).

Todavia, há registros contrastantes em outras populações, no caso de um estudo na Polônia (Kretowski *et al.*, 2002), encontraram que a combinação dos genótipos g.-137GC e g.-607AA estão associados com DM1 e notaram um aumento da frequência alélica do g.-137C em pacientes com DM1. Além da ausência de associação dos SNPs da região promotora do gene *IL-18* com o DM1 em populações Iranianas (Mojtahedi *et al.*, 2006), Tcheco (Novota *et al.*, 2005), Inglesa (Martin *et al.*, 2005; Szeszko *et al.*, 2006) e Croata (Hadzija *et al.*, 2013) além de ausência de correlação do SNP g.-607C>A com DM1 em um estudo de meta-análise, ao abordar várias doenças autoimunes (Pan *et al.*, 2011).

Relatos contrastantes também foram feitos quando se analisaram as associações do SNP *IL-12B* G.*159A>C em pacientes com DM1. Em populações Croatas (Hadzija *et al.*, 2013), Italianas (Nistico *et al.*, 2002),

Irlandeses do Norte (McCormack *et al.*, 2002) , e Noruegueses (Johansson *et al.*, 2001) não obtiveram associações positivas. Em contrapartida, nas populações de famílias euro-descendentes dos EUA (Davoodi-Semiromi *et al.*, 2002), Oeste Australiana (Windsor *et al.*, 2004) e Japoneses (Yang *et al.*, 2006) encontraram associações positivas entre o polimorfismo e a susceptibilidade com DM1. Essas inconsistências podem ser devidas à heterogeneidade entre as populações estudadas, heterogeneidade da metodologia empregada na escolha dos pacientes na participação dos estudos, como também a interação gênica entre o *IL-18* e *IL-12B*.

Em relação ao SNP g.-137G>C (rs187238), o centro de Bauru mostrou-se mais divergente em comparação com as amostras de pacientes com diabetes nos estudos de Hadzija (2013), de Tavares (2013) e da população de ancestralidade europeia (CEU), tanto com relação a frequência alélica quanto a genotípica (tabela 11).

Já em relação ao SNP rs3212227, os centros de Bauru, Curitiba e Campinas, foram os mais semelhantes com relação às amostras CEU e de Hadzija (tabela 11).

O centro Bauru foi justamente aquele que se mostrou significativamente ter um aumento na idade de diagnóstico quando presente o g.-137C (tabela 11).

Por outro lado, o g.-607C>A rs1946518 foi o mais heterogêneo, sendo que os centros Brasília, HC-RS e UNIFESP mostraram ser significativamente diferentes ao CEU e os estudos de Hadzija (2013) e Tavares (2013) quando analisado a frequência genotípica do SNP g.-607C>A rs1946518, na qual o centro de HC-RS as amostras com g.-607C demonstraram ter quase uma significativa diminuição da idade de diagnóstico (tabela 11).

TABELA 11 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS SNPS G.-137G>C E G.-607C>A DO GENE *IL-18 E DO G.*159A>C* DO GENE *IL-12B* NAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM DM1 DOS 13 CENTROS DE COLETA COM DADOS DE AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS COM ANCESTRALIDADE EUROPEIA (CEU); DADOS DE AMOSTRAS DO TRABALHO DE HADŽIJA *ET. AL.* (2013); E DO TRABALHO DE TAVARES *ET. AL.* (2013).

Centro	rs187238						rs1946518						rs3212227			
	Alélica			Genotípica			Alélica			Genotípica			Alélica		Genotípica	
	CEU	Hadzija	Tavares	CEU	Hadzija	Tavares	CEU	Hadzija	Tavares	CEU	Hadzija	Tavares	CEU	Hadzija	CEU	Hadzija
Bauru	0,0028	0.0041	0.0015	0.0001	0.0027	0.0002	0.0203	0.2351	0.2401	0.0295	0.1761	0.1773	0.8415	0.9203	0.4028	0.1277
UFRJ	0.9833	0.6714	0.8231	0.7518	0.2318	0.1444	0.2987	0.7184	0.9203	0.2921	0.2815	0.2774	0.0606	0.0719	0.0238	0.0528
UERJ	0.2965	0.5541	0.3711	0.0648	0.4131	0.4348	0.1552	0.8065	0.8231	0.1583	0.5967	0.5967	0.0833	0.0925	0.046	0.0325
CIDH	1	0.5777	0.7913	0.1846	0.3482	0.7773	0.1336	0.7184	0.7184	0.0283	0.2753	0.2835	0.0001	0.0001	0.0001	0.0006
Brasília	0.2835	0.5541	0.3537	0.1416	0.0231	0.0021	0.0134	0.1821	0.1884	0.0414	0.046	0.0474	0.0119	0.0079	0.0067	0.0063
FMUSP	0.0588	0.1175	0.0603	0.0574	0.1277	0.0196	0.8415	0.0902	0.0908	0.7733	0.0333	0.0333	0.002	0.0008	0.0071	0.0002
Belém	0.0664	0.1221	0.0783	0.0458	0.1492	0.101	0.1003	0.4463	0.4503	0.1583	0.2253	0.2253	0.001	0.0008	0.0001	0.0057
HC-RS	0.1949	0.3865	0.2351	0.1023	0.4131	0.1726	0.0253	0.2987	0.3055	0.0177	0.0136	0.0136	0.0029	0.0012	0.0072	0.0002
Ceará	0.3323	0.5376	0.4062	0.0985	0.3897	0.4096	0.4386	0.8065	0.8065	0.2161	0.6547	0.6547	0.0081	0.0076	0.0003	0.0341
CEDEBA	0.3173	0.0648	0.1354	0.1773	0.0025	0.0006	0.8415	0.064	0.0648	0.0727	0.017	0.0177	0.0012	0.0004	0.0005	0.0001
Curitiba	0.0778	0.1492	0.0897	0.0672	0.2238	0.0531	0.0238	0.1809	0.1834	0.0189	0.2117	0.2176	0.3961	0.4543	0.2733	0.0925
UNIFESP	0.1407	0.2733	0.175	0.2253	0.075	0.0117	0.0341	0.2579	0.2636	0.0001	0.0001	0.0001	0.0045	0.0034	0.0055	0.0003
Campinas	0.2921	0.5271	0.3623	0.0337	0.2253	0.3125	0.0472	0.3455	0.351	0.2117	0.1277	0.1294	0.3652	0.4666	0.1726	0.1117

Nota: Os valores de p-value que forem significativos estão em negrito.

5.2 Diferenciação das amostras entre os centros.

Com o intuito de analisar as semelhanças entre as amostras, muitos testes foram realizados para avaliar a possibilidade de agrupar as amostras em uma só amostra representativa. Analisando os valores de dispersão das medianas entre os centros foi feita uma comparação para averiguar se essas medianas de idade de diagnóstico seguem um padrão, e pelos resultados explicitados pela tabela 7, as medianas são diferentes. Ao comparar essas medianas, foi possível averiguar uma variedade, sendo Curitiba e Bauru os mais semelhantes e Campinas a mais diferente (Tabela 7).

Através do programa “Alleles in Space” (Miller, 2005) foi possível analisar as diferenças genéticas entre os centros de forma visual. Sendo que quanto mais semelhantes as amostras analisadas, mais plana será a figura renderizada. Ao usar os dados dos três SNPs (figura 9), podemos visualizar que os centros mais ao Norte demonstram possuir uma diferença maior em comparação com os centros do Sul do Brasil. Esta tendência continua ao se usar os dois SNPs (g.-137G>C e g.-607C>A) do gene *IL-18* (figura 10). Por outro lado, ao usar somente o SNP g.*159A>C do gene *IL-12B* a diferença significativamente maior se encontra no Sul, destacada pelo pico maior azul, formando um gradiente (figura 11), que é corroborado pelos dados da figura 8.

Concordando com os resultados de dispersão e os de frequências alélicas e genotípicas, com amostras não estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg, os dados extraídos pelo teste de diferenciação (tabela 5) renderizado pelo programa Arlequin (Excoffier and Lischer, 2010) também ressalta a heterogeneidade apresentada pelas amostras coletadas nos 13 centros. Esse panorama sugere que as amostras não poderiam ser agrupadas e analisadas como uma só amostra. Sendo que a amostra do UFRJ se mostrou a mais semelhante de todas, enquanto que a amostra advinda de Curitiba foi a mais diferente de todas.

5.3 Genes *IL-18* e *IL-12B* e idade de diagnóstico do DM1.

Embora não associada com a susceptibilidade do DM1 com os SNPs *IL-18 g.-137G>C* / *g.-607C>A* e *IL-12B g.*159A>C*, foi observado uma menor idade de aparecimento do DM1 em pacientes que portaram uma ou duas cópias dos alelos *IL-18 g.-137C* ou *g.-607A* em comparação com aqueles que portam o alelo usual em homozigose (*g.-137G* ou *g.-607C*) (Hadzija *et al.*, 2013). Fato também observado, para o SNP *IL-18 g.-137G>C*, em pacientes com DM1 em uma população Turca (Altinova *et al.*, 2008) sendo que os pacientes que portaram o alelo *IL-18 g.-137C* em homozigose, eram diagnosticados muito mais precocemente em comparação com os pacientes que portavam o alelo G em homozigose (10 anos vs 17 anos). No estudo de Hadzija (2013), foi demonstrado que a presença concomitante dos alelos *g.-137C* e *g.-607A* diminui, ainda mais, a idade de diagnóstico. Fato não corroborado em estudo com a população Inglesa (Martin *et al.*, 2005).

No nosso estudo, ao analisar cada centro em separado, em muitos se mostrou ser verdadeira a presença do *g.-137C*, com um efeito protetor, não corroborando com os dados observados por Hadzija (2013). Como pode ser visto ao analisar os gráficos de Boxplot (figuras 15), com os dados dos genótipos dos SNPs *g.-137G>C* e *g.-607C>A* do gene *IL-18* e o *IL-12B g.*159A>C* em cada centro de coleta, comparadas com a idade de diagnóstico dos pacientes e, estatisticamente, ao comparar os genótipos dos alelos usuais contra os outros (tabela 8), há diferença significativa no centro de Bauru, mostrando uma maior idade de diagnóstico quando há a presença do *g.-137C*, enquanto que há uma tendência para significância para o centro do HC-RS quando há a presença do *g.-607A*. Para esse polimorfismo, o sentido da presença do *g.-607A* corrobora com os achados de Hadzija (2013.)

Para Hadzija (2013), nenhuma associação positiva com relação a idade de diagnóstico foi feita ao se analisar o SNP *IL-12B g.*159A>C* sozinho, mas uma associação positiva foi encontrada quando analisada em conjunto com os SNPs da região promotora do gene *IL-18 (g.-137G>C e g.-607C>A)*. Sendo que os pacientes que portavam ao menos três alelos não usuais (*IL-18 g.-137C; g.-607A e IL-12B g.*159C*) eram diagnosticados com 16 anos de idade em comparação com os pacientes que não portavam esses alelos eram

diagnosticados com 25 anos. No presente estudo, também não houve associação positiva com a idade de diagnóstico quando se analisa somente o SNP *g.*159A>C* do gene *IL-12B* sozinho.

Quando a idade de diagnóstico é comparada com todas as possíveis combinações de genótipos ou grupos de genótipos (enumeradas na tabela 9) os centros de Bauru, Ceará e CEDEBA mostram uma tendência a diferenças significativas, sendo ressaltadas, de forma estatística, na tabela 10.

6. Conclusões

1. Não foi possível juntar as amostras de diferentes centros de coleta em uma só amostra representativa, devido à diferença entre elas, tanto com relação às frequências genotípicas quanto na mediana da idade de diagnóstico.

2. O SNP g.-137G>C do gene *IL-18* está associado com a idade mais tardia do diagnóstico do DM1 apenas no centro de Bauru, enquanto que o SNP g.-607C>A, do mesmo gene, apenas está associado no centro de HC-RS com efeito mais precoce da idade de diagnóstico.

A análise dos genótipos agrupados do *IL-18* mostrou tendência à significância somente nos centros de Bauru, Ceará e CEDEBA.

Portanto, não foi possível tirar uma conclusão geral para todos os centros.

3. Em consonância com os achados na população Croata, também não houve associação positiva com a idade de diagnóstico quando se analisa somente o SNP g.*159A>C do gene *IL-12B*.

Referências

_____. Prevalence of gestational diabetes mellitus--do the new WHO criteria make a difference? Brazilian Gestational Diabetes Study Group. *Diabet Med*, v. 17, n. 5, p. 376-80, May 2000.

AL-JENAIDI, F. A., WAKIM-GHORAYEB, S. F., AL-ABBASI, A., AREKAT, M. R., IRANI-HAKIME, N., NAJM, P., AL-OLA, K., MOTALA, A. A., ALMAWI, W. Y., Contribution of selective HLA-DRB1/DQB1 alleles and haplotypes to the genetic susceptibility of type 1 diabetes among Lebanese and Bahraini Arabs. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90:5104–5109. 2005.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, v. 15, n. 7, p. 539-53, Jul 1998.

ALPER, C.A., LARSEN, C.E., DUBEY, D.P., AWDEH, Z.L., FICI, D.A., YUNIS, E.J. The haplotype structure of the human major histocompatibility complex. *Hum Immunol* 67:73–84. 2006.

ALTINOVA, A. E. et al. Serum IL-18 levels in patients with type 1 diabetes: relations to metabolic control and microvascular complications. In: (Ed.). *Cytokine*. United States, v.42, 2008. p.217-21.

AN P, HONG Y, WEISNAGEL SJ, RICE T, RANKINEN T et al., Genomic scan of glucose and insulin metabolism phenotypes: the HERITAGE Family Study. *Metabolism*.;52:246–253. 2003.

ATKINSON, M.A. Thirty Years of Investigating the Autoimmune Basis for Type 1 Diabetes: Why Can't We Prevent or Reverse This Disease? *Diabetes*; 54:1253–63. 2005.

BACH, J. F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*, v. 347, n. 12, p. 911-20, Sep 19 2002.

BADENHOOP, K., DONNER, H., PANI, M., RAU, H., SIEGMUND, T., BRAUN, J. Genetic susceptibility to type 1 diabetes: clinical and molecular heterogeneity of IDDM1 and IDDM2 in a German population. *ExpClinEndocrinol Diabetes*; 107 (Suppl 3): S89-92. 1999.

BAEKESKOV, S. et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*, v. 347, n. 6289, p. 151-6, Sep 13 1990.

BARKER, J.M., GOHRIG, S.H., BARRIGA, K. *et al.*, "Clinical characteristics of children diagnosed with type 1 diabetes through intensive screening and follow-up," *Diabetes Care*, vol. 27, no.6, pp. 1399–1404, 2004.

BARRATT, B.J., PAYNE, F., LOWE, C.E., HERMANN, R., HEALY, B.C., HAROLD D. et al., Remapping the insulin gene/IDDM2 *locus* in type 1 diabetes. *Diabetes*; 53:1884–1889. 2004.

BARRETT, J.C., CLAYTON, D.G., CONCANNON, P., AKOLKAR, B., COOPER, J.D., ERLICHHA, JULIER, C., MORAHAN, G., NERUP, J., NIERRAS, C., PLAGNOL, V., POCIOTF, SCHUILENBURG, H., SMYTH, D.J., STEVENS, H., TODD, J.A., WALKER, N.M., RICH, S.S. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 *loci* affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 41:703–707 2009.

BEGOVICH, A.B., CARLTON, V.E., HONIGBERG, L.A., SCHRODI, S.J., CHOKKALINGAM, A.P., ALEXANDER, H.C. et al., A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*; 75:330–337. 2004.

BERGHOLDT, R., GHANDIL, P., JOHANNESSEN, J., KRISTIANSEN, O.P.,

KOCKUM, I., LUTHMAN, H. et al., Genetic and functional evaluation of an interleukin-12 polymorphism (IDDM18) in families with type 1 diabetes. *J Med Genet*;41:e39. 2004.

BINGLEY, P.J. "Clinical applications of diabetes antibody testing," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol.95, no. 1, pp. 25–33, 2010.

BONNEVIE-NIELSEN, V., FIELD, L.L., LU, S., ZHENG, D.J., LI, M., MARTENSEN, P.M. et al., Variation in antiviral 2',5'-oligoadenylate synthetase (2'5'AS) enzyme activity is controlled by a single-nucleotide polymorphism at a splice-acceptor site in the OAS1 gene. *Am J Hum Genet*; 76:623–633 2005.

BOTTINI, N., GLORIA-BOTTINI, F., BORGIANI, P., ANTONACCI, E., LUCARELLI, P., BOTTINI, E. Type 2 diabetes and the genetics of signal transduction: a study of interaction between adenosine deaminase and acidphosphatase/locus 1 polymorphisms. *Metabolism*; 53:995–1001 2004.

BOTTINI, N., MUSUMECI, L., ALONSO, A., RAHMOUNI, S., NIKA, K., ROSTAMKHANI, M. et al., A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet*;36:337–338. 2004.

BOUQBIS, L., AKHAYAT, O., GARCHON, H.J., CALAFELL, F., IZAABEL, H. TNFA-TNFB haplotypes modify susceptibility to type I diabetes mellitus independently of HLA class II in a Moroccan population. *Tissue Antigens*; 61:72–9. 2003.

BOUTLIS, C.S., LAGOG, M., CHAISAVANEYAKORN, S., MISUKONIS, M.A., BOCKARIE, M.J., MGONE, C.S. et al., Plasma interleukin-12 in malaria-tolerant Papua New Guineans: inverse correlation with *Plasmodium falciparum* parasitemia and peripheral blood mononuclear cell nitric oxide synthase activity. *Infect Immun*; 71:6354–6357. 2003.

BREKKE, H.K., LUDVIGSSON, J. Vitamin D supplementation and diabetes-related autoimmunity in the ABIS study. *Pediatr Diabetes*; 8:11–14. 2007.

BRUINING, G.J., MOLENAAR, J.L., GROBBEEETAI, D.E. “Ten-year follow-up study of islet-cell antibodies and childhood diabetes mellitus,” *The Lancet*, vol. 1, no. 8647, pp. 1100–1103, 1989.

BUCHANAN, T. A. et al. Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol*, v. 162, n. 4, p. 1008-14, Apr 1990.

BUGAWAN, T.L., KLITZ, W., ALEJANDRINO, M., CHING, J., PANELO, A., SOLFELIX, C.M. *et al.*, The association of specific HLA class I and II alleles with type 1 diabetes among Filipinos. *Tissue Antigens*; 59:452–469. 2002.

CAPON, F., DI MEGLIO, P., SZAUB, J., PRESCOTT, N.J., DUNSTER, C., BAUMBER, L. *et al.*, Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL-12B) confer protection against psoriasis. *Hum Genet*; 122:201–206. 2007.

CARGILL, M., SCHRODI, S.J., CHANG, M., GARCIA, V.E., BRANDON, R., CALLIS, K.P. *et al.*, A large-scale genetic association study confirms IL-12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet*; 80:273–290. 2007.

CEBECI, A. N. et al. The role of IL-18 in Th1/Th2 balance in children. *Allergy Asthma Proc*, v. 27, n. 4, p. 365-70, Jul-Aug 2006.

CHATILA, T.A. Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis. *Trends Mol Med*; 10:493–499. 2004.

CHELALA, C., DUCHATELET, S., JOFFRET, M.L., BERGHOLDT, R.,

DUBOIS-LAFORGUE, D., GHANDIL, P. *et al.*, PTPN22R620W functional variant in type 1 diabetes and autoimmunity related traits. *Diabetes*; 56:522–526 2007.

CHEN G., ADEYEMO A.A., ZHOU J., CHEN Y., DOUMATEY A., LASHLEY K., HUANG H., AMOAH A., AGYENIM-BOATENG K., EGHAN B.A. A genome-wide search for linkage to renal function phenotypes in West Africans with type 2 diabetes. *Am. J. Kidney Dis.*;49:394–400 2007.

CHEN SF, LU XF, YAN WL, HUANG JF, GU DF. Variations in the calpain-10 gene are associated with the risk of type 2 diabetes and hypertension in northern Han Chinese population. *Chin Med J (Engl)*;120(24):2218–2223. 2007.

CHISHOLM, D.J. Medical Problems in sport – Diabetes Mellitus. In: Sherry E, Wilson SF, editors. *Oxford handbook of sports medicine*. 1st ed. Oxford (NY): Oxford University Press, 1998.

CLOUTIER, J.F., VEILLETTE, A. *et al.*, ASSOCIATION OF INHIBITORY TYROSINE PROTEIN KINASE P50CSK WITH PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE PEP IN T CELLS AND OTHER HEMOPOIETIC CELLS". *EMBO J.* **15** (18): 4909–18. 1996.

CLOUTIER, J.F., VEILLETTE, A. Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. *J Exp Med*; 89:111–121. 1999.

CONCANNON, P., ONENGUT-GUMUSCU, S., TODD, J.A., SMYTH, D.J., POCIOT, F., BERGHOLDT, R. *et al.*, A human type1 diabetes susceptibility *locus* maps to chromosome 21q22.3. *Diabetes*; 57:2858–2861. 2008.

COOPER, J.D., SMYTH, D.J., BAILEY, R., PAYNE, F., DOWNES, K. GODFREY, L.M. *et al.*, The candidate genes TAF5L, *TCF7*, PDCD1, IL6 and

ICAM1 cannot be excluded from having effects in type 1 diabetes. *BMC Med Genet*;8:71. 2007.

COOPER, J.D., SMYTH, D.J., SMILES, A.M., PLAGNOL, V., WALKER, N.M., ALLEN, J.E., DOWNESK, BARRETT, J.C., HEALY, B.C., MYCHALECKYJ, J.C., WARRAM, J.H., TODD, J.A. Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk *loci*. *Nat Genet*; 40:1399–1401 2008.

COX, N.J., WAPELHORST, B., MORRISON, V.A., JOHNSON, L., PINCHUK, L., SPIELMAN, R.S., TODD, J.A., CONCANNON, P. Seven regions of the genome show evidence of linkage to type 1 diabetes in a consensus analysis of 767 multiplex families. *Am J Hum Genet*. 69(4):820-830. 2001.

CUCCA, F., LAMPIS, R., CONGIA, M., ANGIUS, E., NUTLAND, S., BAIN, S.C. et al., A correlation between the relative predisposition of MHC class II alleles to type 1 diabetes and the structure of their proteins. *Hum Mol Genet*;10:2025–2037. 2001.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers., 1997-10-01 1997.

DAHL-JORGENSEN, K., JONER, G., HANSSEN, K.F. Relationship between cows' milk consumption and incidence of IDDM in childhood. *Diabetes Care*.v.14, p.1081–3, 1991.

DAS, S.N., BANIASADI, V., KAPURIA, V. Association of -308 TNF-alpha promoter polymorphism with type1 diabetes in North Indians. *Int J Immunogenet*;33:411–6. 2006.

DAVOODI-SEMIROMI, A., YANG, J.J., SHE, J.X. IL-12p40 is associated with type 1 diabetes in Caucasian-American families. *Diabetes*;51:2334–2336. 2002.

DE BAKKER, P.I., MCVEAN, G., SABETI, P.C., MIRETTI, M.M., GREEN, T., MARCHINI, K.E., X, MONSUUR, A.J., WHITTAKER, P., DELGADO, M., MORRISON, J., RICHARDSON, A., WALSH, E.C., GAO, X., GALVER, L., HART, J., HAFER, D.A., PERICAK-VANCE, M., TODD, J.A., DALY, M.J., TROWSDALE, J., WIJMENGA, C., VYSE, T.J., BECK, S., MURRAY, S.S., CARRINGTON, M., GREGORY, S., DELOUKAS, P., RIOUX, J.D. A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. *Nat Genet* 38:1166–1172 2006.

DE TOGNI, P., GOELLNER, J., RUDDLE, N.H., STREETER, P.R., FICK, A., MARIATHASAN, S. et al., Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science*;264:703–7. 1994.

DEJA, G., JAROSZ-CHOBOT, P., POLAŃSKA, J., SIEKIERA, U., MAŁECKA-TENDERA, E. Is the association between TNF- α -308 A allele and DMT1 independent of HLA-DRB1, DQB1 alleles? *Mediators Inflamm* 1–7. 2006.

DENDROU, C.A., PLAGNOL, V., FUNG, E., YANG, J.H., DOWNES, K., COOPER, J.D. et al., Cell-specific protein phenotypes for the autoimmune *locus* IL2RA using a genotype-selectable human bio resource. *Nat Genet*;41:1011–1015. 2009.

DENDROU, C.A., WICKER, L.S. The IL-2/CD25 pathway determines susceptibility to T1D in humans and NOD mice. *J Clin Immunol*;6:685–696 2008.

DENG, G.Y., MACLAREN, N.K., HUANG, H.S., ZHANG, L.P., SHE, J.X. No primary association between the 308 polymorphism in the tumor necrosis factor α promoter region and insulin-dependent diabetes mellitus. *Hum Immunol*;5:137–42. 1996.

Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v. 36 Suppl 1, p. S67-74, Jan 2013.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*, v. 37 Suppl 1, p. S34-45, Nov 2007.

DING, Y., CONG, L., IONITA-LAZA, I., LO, S.H., ZHENG, T. Constructing gene association networks for rheumatoid arthritis using the backward genotype-trait association (BGTA) algorithm. *BMC Proc*;1(Suppl 1):S13. 2007.

DONG, G. P. et al. IL-18 gene promoter -137C/G and -607C/A polymorphisms in Chinese Han children with type 1 diabetes mellitus. In: (Ed.). *Int J Immunogenet*. England, v.34, 2007. p.75-9.

DONNER, H., RAU, H., WALFISH, P.G., BRAUN, J., SIEGMUND, T., FINKE, R., HER-WIGJ, USADEL, K.H., BADENHOOP, K. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and type 1 diabetes mellitus. *J ClinEndocrinolMetab*; 82: 143-6. 1997.

DORNHORST, A. et al. High prevalence of gestational diabetes in women from ethnic minority groups. *Diabet Med*, v. 9, n. 9, p. 820-5, Nov 1992.

DOYLE, H.A., GEE, R.L., MAMULA, M.J. A failure to repair self-proteins leads to T cell hyperproliferation and autoantibody production. *J Immunol*. 171(6):2840-2847. 2003.

EISENBARTH, G.S., GOTTLIEB, P.A. "Medical progress: autoimmune polyendocrine syndromes," *The New England Journal of Medicine*, vol. 350, no. 20, pp. 2068–2079, 2004.

ERLICH, H., VALDES, A.M., NOBLE, J., CARLSON, J.A., VARNEY, M., CONCANNON, P., MYCHALECKYJ, J.C., TODD, J.A., BONELLA, P., FEAR,

A.L., LAVANT, E., LOUEYA, MOONSAMY, P. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes* 57:1084–1092 2008.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*, v. 10, n. 3, p. 564-7, May 2010.

FEUGEAS, J.P., CAILLENS, H., POIRIER, J.C., CHARRON, D., MARCELLI-BARGE, A., WAUTIER, J.L. Influence of metabolic and genetic factors on tumor necrosis factor- α and lymphotoxin- α production in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab*;23:295–301. 1997.

FIELD, L.L., BONNEVIE-NIELSEN, V., POCIOT, F., LU, S., NIELSEN, T.B., BECK-NIELSEN, H. OAS1 splice site polymorphism controlling antiviral enzyme activity influences susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes*;54:1588–1591. 2005.

FONTENOT, J.D., RASMUSSEN, J.P., GAVIN, M.A., RUDENSKY, A.Y. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*; 6:1142–1151 2005.

FREIDIN, M.B., RUDKO, A.A., KOLOKOLOVA, O.V., STRELIS, A.K., PUZYREV, V.P. Association between the 1188 A/C polymorphism in the human IL-12B gene and Th1-mediated infectious diseases. *Int J Immunogenet*;33:231–232. 2006.

FUNG, E., SMYTH, D.J., HOWSON, J.M., COOPER, J.D., WALKER, N.M., STEVENS, H. *et al.*, Analysis of 17 auto immune disease-associated variants in type 1 diabetes identifies 6q23/TNFAIP3 as a susceptibility *locus*. *Genes Immun*;10:188–191. 2008.

Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases

and 3,000 shared controls. *Nature*;447:661–678. 2007.

GIEDRAITIS, V. et al. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. In: (Ed.). *J Neuroimmunol. Netherlands*, v.112, 2001. p.146-52.

GILLESPIE, K.M., GALE, E.A., BINGLEY, P.J., High familial risk and genetic susceptibility in early onset childhood diabetes. *Diabetes* 51:210–214. 2002.

GIULIETTI, A., GYSEMANS, C., STOFFELS, K., VAN ETEN, E., DECALLONNE, B., OVERBERGH, L. et al., Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia*;47:451–462. 2004.

GLASER, B., NIKOLOV, I., CHUBB, D., HAMSHERE, M., SEGURADO, R., MOSKVINA, V. et al., Analyses of single marker and pair wise effects of candidate *loci* for rheumatoid arthritis using logistic regression and random forests. *BMC Proc*;1(Suppl 1):S54. 2007.

GORUS, F. K. et al. IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetologia*, v. 40, n. 1, p. 95-9, Jan 1997.

GRANT SF, THORLEIFSSON G, REYNISDOTTIR I, BENEDIKTSSON R, MANOLESCU A et al., Variant of transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*;38:320–323. 2006.

GREER, R.M., ROGERS, M.A., BOWLING, F.G., BUNTAIN, H.M., HARRIS, M., LEONG, G.M. et al., Australian children and adolescents with type 1 diabetes have low vitamin D levels. *Med J Aust*;187:59–60 2007.

GROOP, L.C., BOTTAZZO, G.F., DONIACH, D., “Isletcellanti-bodies identify

latent type 1 diabetes in patients aged 35–75 years at diagnosis,” *Diabetes*, vol. 35, no. 2, pp. 237–241, 1986.

GULER, M.L., GORHAM, J.D., DIETRICH, W.F., MURPHY, T.L., STEEN, R.G., PARVIN, C.A. et al., Tpm1, a *locus* controlling IL-12 responsiveness, acts by a cell-autonomous mechanism. *J Immunol*;162:1339–1347. 1999.

GUO, D., HAN, J., ADAM, B.L., COLBURN, N.H., WANG, M.H., DONG, Z. et al., Proteomic analysis of SUMO4 substrates in HEK293 cells under serum starvation-induced stress. *Biochem Biophys Res Commun*; 337:1308–1318. 2005.

GUO, D., LI, M., ZHANG, Y., YANG, P., ECKENRODE, S., HOPKINS, D. et al., A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet*;36:837–841 2004.

GYSEMANS, C., VAN ETTEN, E., OVERBERGH, L., GIULIETTI, A., EELEN, G., WAER, M. et al., Unaltered diabetes presentation in NOD mice lacking the vitamin D receptor. *Diabetes*;57:269–275 2008.

HADŽIJA, M.P., KOROLIJA, M., JEMIN, N., PAVKOVIĆ, I., PAVKOVIĆ, P. Polymorphisms in the IL-18 and IL-12B genes and their association with the clinical outcome in Croatian patients with Type 1 diabetes. *Gene* 512 477–481. 2013.

HAKONARSON, H., GRANT, S.F., BRADFIELD, J.P., MARCHAND, L., KIM, C.E., GLESSNER, J.T., GRABS, R., CASALUNOVO, T., TABACK, S.P., FRACKELTON, E.C., LAWSON, M.L., ROBINSON LJ, SKRABAN, R., LU, Y., CHIAVACCI, R.M., STANLEY, C.A., KIRSCH, S.E., RAPPAPORT, E.F., ORANGE, J.S., MONOS, D.S., DEVOTO, M., QU, H.Q., POLYCHRONAKOS, C. : A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature* 448:591–594, 2007.

HAKONARSON, H., QU, H.Q., BRADFIELD, J.P., MARCHAND, L., KIM, C.E., GLESSNER, J.T., GRABS, R., CASALUNOVO, T., TABACK, S.P., FRACKELTON, E.C., ECKERT, A.W., ANNAIAH, K., LAWSON, M.L., OTIENO, F.G., SANTA, E., SHANER, J.L., SMITH, R.M., ONYIAH, C.C., SKRABANR, CHIAVACCI, R.M., ROBINSON, L.J., STANLEY, C.A., KIRSCH, S.E., DEVOTO, M., MONOSDS, GRANT, S.F., POLYCHRONAKOS, C: A novel susceptibility *locus* for type 1 diabetes on Chr12q13 identified by a genome-wide association study. *Diabetes* 57:1143–1146, 2008

HALLENGREN, B., FALORNI, A., LANDIN-OLSSON, M., LERNMARK, A., PAPADOPOULOS, K. I., SUNDKVIST, G. "Islet cell and glutamic acid decarboxylase antibodies in hyperthyroid patients: at diagnosis and following treatment," *Journal of Internal Medicine*, vol. 239, no. 1, pp. 63–68, 1996.

HAUPTMANN, G., BAHRAM, S. Genetics of the central MHC. *Curr Opin Immunol*;16(5):668–72 2004.

HENRY, O. A.; BEISCHER, N. A. Long-term implications of gestational diabetes for the mother. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, v. 5, n. 2, p. 461-83, Jun 1991.

HERMANN, R., LIPPONEN, K., KIVINIEMI, M., KAKKO, T., VEIJOLA, R., SIMELL, O. et al., Lymphoid tyrosine phosphatase (LYP/PTPN22) Arg620Trp variant regulates insulin autoimmunity and progression to type 1 diabetes. *Diabetologia*;49:1198–1208. 2006.

HOLICK, M.F. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr*;79:362–371. 2004.

HORTON, R., WILMING, L., RAND, V., LOVERING, R.C., BRUFORD, E.A., KHODIYARVK, LUSH, M.J., POVE, Y S., TALBOT, C.C. JR, WRIGHT, M.W., WAIN, H.M., TROWSDALE, J., ZIEGLER, A., BECK, S. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 5:889–899 2004.

HOU, S., YANG, P., DU, L., ZHOU, H., LIN, X., LIU, X. et al., SUMO4 gene polymorphisms in Chinese Han patients with Behcet's disease. *Clin Immunol*;129:170–175. 2008.

HOWSON, J.M., WALKER, N.M., CLAYTON, D., TODD, J.A. Confirmation of HLA class II independent type 1 diabetes associations in the major histocompatibility complex including HLA-B and HLA-A. *Diabetes Obes Metab*;11 (Suppl 1):31–45. 2009.

HOWSON, J.M.M., WALKER, N.M., SMYTH, D.J., TODD, J.A., THE TYPE I DIABETES GENETICS CONSORTIUM. Analysis of 19 genes for association with type I diabetes in the Type I Diabetes Genetics Consortium families. *Genes Immun*. 2009 December ; 10(Suppl 1): S74–S84., 2009.

HU C, WANG C, ZHANG R, MA X, WANG J et al., Variations in KCNQ1 are associated with type 2 diabetes and beta cell function in a Chinese population. *Diabetologia*.;52:1322–1325.2009.

HULBERT, E.M., SMINK, L.J., ADLEM, E.C., ALLEN, J.E., BURDICK, D.B. et al., T1DBase: integration and presentation of complex data for type 1 diabetes research. *Nucleic Acids Res*;35:D742–6. 2007.

HYPPONEN, E., LAARA, E., REUNANEN, A., JARVELIN, M.R., VIRTANEN, S.M. Intake of vitamin D and risk of type1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*;358:1500–1503. 2001.

IBELGAUFTS, H. cytokines (Cytokines & Cells Encyclopedia - COPE). 2015.

IDE, A. et al. Association between IL-18 gene promoter polymorphisms and CTLA-4 gene 49A/G polymorphism in Japanese patients with type 1 diabetes. In: (Ed.). *J Autoimmun*. England, v.22, 2004. p.73-8.

IONESCU-TIRGOVISTE, C., GUJA, C., HERR, M., CUCCA, E., WELSH, K., BUNCE, M., MARSHALL, S., TODD, J. A. Low frequency of HLA DRB1*03-DQB1*02 and DQB1*0302 haplotypes in Romania is consistent with the country's low incidence of type I diabetes. *Diabetologia* 44(Suppl. 3):B60–B66. 2001.

IVANSSON, E.L., GUSTAVSSON, I.M., MAGNUSSON, J.J., STEINER, L.L., MAGNUSSON, P.K., ERLICH, H.A. et al., Variants of chemokine receptor 2 and interleukin 4 receptor, but not interleukin 10 or Fas ligand, increase risk of cervical cancer. *Int J Cancer*;121:2451–2457 2007.

JI L, MALECKI M, WARRAM JH, YANG Y, RICH SS et al., New susceptibility locus for NIDDM is localized to human chromosome 20q. *Diabetes*;46:876–881. 1997.

JARVELA, I. Y. et al. Gestational diabetes identifies women at risk for permanent type 1 and type 2 diabetes in fertile age: predictive role of autoantibodies. *Diabetes Care*, v. 29, n. 3, p. 607-12, Mar 2006.

JOHANSSON, S., LIE, B.A., THORSBY, E., UNDLIEN, D.E. The polymorphism in the 3' untranslated region of IL-12B has a negligible effect on the susceptibility to develop type 1 diabetes in Norway. *Immunogenetics*;53:603–605 2001.

JUSTESEN, J., HARTMANN, R., KJELDGAARD, N.O. Gene structure and function of the 2'–5'-oligoadenylate synthetase family. *Cell Mol Life Sci*;57:1593–1612 2000.

KAHN, R. "Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus," *Diabetes Care*, vol. 20, no. 7, pp. 1183–1197, 1997.

KASTELEIN, R.A., HUNTER, C.A., CUA, D.J. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol*;25:221–242 2007.

KAUTZKY-WILLER, A. et al. Pronounced insulin resistance and inadequate beta-cell secretion characterize lean gestational diabetes during and after pregnancy. *Diabetes Care*, v. 20, n. 11, p. 1717-23, Nov 1997.

KAWABATA, Y., IKEGAMI, H., KAWAGUCHI, Y., FUJISAWA, T., SHINTANI, M., ONO, M., NISHINO, M., UCHIGATA, Y., LEE, I., OGIHARA, T. Asian-specific HLA haplotypes reveal heterogeneity of the contribution of HLA-DR and –DQ haplotypes to susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes* 51:545–551. 2002.

KAWASAKI, E., ABIRU, N., YANO M. et al., “Auto antibodies to glutamic acid decarboxylase in patients with autoimmune thyroid disease: relation to competitive insulin auto antibodies,” *Journal of Autoimmunity*, vol. 8, no. 5, pp. 633–643, 1995.

KAWASAKI, E., TAKINO, H., YANO M. et al., “Auto antibodies to glutamic acid decarboxylase in patients with IDDM and autoimmune thyroid disease,” *Diabetes*, vol.43, no.1, pp.80–86, 1994.

KIM, C.; NEWTON, K. M.; KNOPP, R. H. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care*, v. 25, n. 10, p. 1862-8, Oct 2002.

KIM, K.A., KIM, S., CHANG, I., KIM, G.S., MIN, Y.K., LEE, M.K. et al., IFN gamma/TNF alpha synergism in MHC class II induction: Effect of nicotinamide on MHC class II expression but not on islet-cell apoptosis. *Diabetologia*;45:385–93. 2002.

KNIP, M.; SILJANDER, H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmunity Reviews* v.7, p.550–557, 2008.

KOCKUM, I., SANJEEVI, C.B., EASTMAN, S., LANDIN-OLSSON, M.,

DAHLQUIST, G., LERNMARK, A. Complex interaction between HLA DR and DQ in conferring risk for childhood type 1 diabetes. *Eur. J. Immunogenet.* 26:361–372. 1999.

KOELEMAN, B.P., DUDBRIDGE, F., CORDELL, H.J., TODD, J.A. Adaptation of the extended transmission/disequilibrium test to distinguish disease associations of multiple *loci*: the conditional extended transmission/disequilibrium test. *Ann Hum Genet* 64:207–213 2000.

KOELEMAN, B.P., HERR, M.H., ZAVATTARI, P., DUDBRIDGE, F., MARCH, R., CAMPBELL, D., BARNETT, A.H., BAIN, S.C., MULARGIA, A.P., LODDO, M., AMOS, W., CUCCA, F., TODD, J.A. Conditional ETDT analysis of the human leukocyte antigen region in type 1 diabetes. *Ann Hum Genet* 64:215–221 2000.

KOELEMAN, B.P., LIE, B.A., UNDLIEN, D.E., DUDBRIDGE, F., THORSBY, E., DEVRIES, R.R., CUCCA, F., ROEP, B.O., GIPHART, M.J., TODD, J.A. Genotype effects and epistasis in type 1 diabetes and HLA-DQ trans dimer associations with disease. *Genes Immun* 5:381–388 2004.

KRETOWSKI, A. et al. Interleukin-18 promoter polymorphisms in type 1 diabetes. *Diabetes*, v. 51, n. 11, p. 3347-9, Nov 2002.

KU, D.H., CHANG, C.D., KONIECKI, J., CANNIZZARO, L.A., BOGHOSIAN-SELL, L., ALDER, H., BASERGA, R. A new growth-regulated complementary DNA with the sequence of a putative trans-activating factor. *Cell Growth Differ* 2:179–186 1991.

KUHL, C. Insulin secretion and insulin resistance in pregnancy and GDM. Implications for diagnosis and management. *Diabetes*, v. 40 Suppl 2, p. 18-24, Dec 1991.

KUMAR, R., GOSWAMI, R., AGARWAL, S., ISRANI, N., SINGH, S.K., RANI,

R. Association and interaction of the TNF- α gene with other pro- and anti-inflammatory cytokine genes and HLA genes in patients with type 1 diabetes from North India. *Tissue Antigens*;69:557–67 2007.

KYOGOKU, C., LANGEFELD, C.D., ORTMANN, W.A., LEE, A., SELBY, S., CARLTON, V.E. *et al.*, Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet*;75:504–507. 2004.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER Jr, J.I. A rapid nonenzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, Oxon, v. 19, p. 5444, 1991.

LANE, P. Regulation of T and B cell responses by modulating interactions between CD28/CTLA4 and their ligands, CD80 and CD86. *Ann NY Acad Sci*; 815: 392-400. 1997.

LANGRISH, C.L., MCKENZIE, B.S., WILSON, N.J., DE WAAL MALEFYT, R., KASTELEIN, R.A., CUA, D.J. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*;202:96–105. 2004.

LAWRENCE, J. M. *et al.* Trends in the prevalence of preexisting diabetes and gestational diabetes mellitus among a racially/ethnically diverse population of pregnant women, 1999-2005. *Diabetes Care*, v. 31, n. 5, p. 899-904, May 2008.

LEE, Y.J., HUANG, F.Y., LO, F.S., WANG, W.C., HSU, C.H., KAO, H.A., YANG, T.Y., CHANG, J.G. Association of CTLA4 gene A-G polymorphism with type 1 diabetes in Chinese children. *Clin Endocrinol (Oxf)*; 52: 153-7. 2000.

LEMOES, M.C., FAGULHA, A., COUTINHO, E., GOMES, L., BASTOS, M., BARROS, L. *et al.*, Lack of association of vitamin D receptor gene

polymorphisms with susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Portuguese population. *Hum Immunol*;69:134–138. 2008.

LESLIE, R.D.G., ATKINSON, M.A., NOTKINS, A.L. "Autoantigens IA-2 and GAD in type I (insulin-dependent) diabetes, "Diabetologia, vol. 42, no. 1, pp. 3–14, 1999.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, v. 127, n. 2, p. 117-26, Feb 2000.

LOWE, C.E., COOPER, J.D., BRUSKO, T., WALKER, N.M., SMYTH, D.J., BAILEY, R., BOURGETK, PLAGNOL, V., FIELD, S., ATKINSON, M., CLAYTON, D.G., WICKER, L.S., TODD, J.A. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype association simplicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet*;9:1074–1082 2007.

LYSSENKO V, NAGORNY CL, ERDOS MR, WIERUP N, JONSSON A et al., Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet*.;41:82–88. 2009.

MAIER, L.M., LOWE, C.E., COOPER, J., DOWNES, K., ANDERSON, D.E., SEVERSON, C. et al., IL2RA genetic heterogeneity in multiple sclerosis and type 1 diabetes susceptibility and soluble interleukin-2 receptor production. *PLoS Genet*;5:e1000322 2009.

MAKHATADZE, N.J. Tumor necrosis factor *locus*: Genetic organization and biological implications. *Hum Immunol*;59:571–9. 1998.

MARCHETTI, P., DOTTA, F., ZHONG, L., LUPI, R., DEL GGUERRA, S., SANTANGELO, C. et al., The function of pancreatic islets isolated from type 1 diabetic patient. *Diabetes Care*. v.23, p.701-3, 2000.

MARQUET, S., DOUMBO, O., CABANTOUS, S., POUDIOUGOU, B.,

ARGIRO, L., SAFEUKUI, I. et al., A functional promoter variant in IL-12B predisposesto cerebral malaria. *Hum Mol Genet*;17:2190–2195. 2008.

MARRON, M.P., RAFFEL, L.J., GARCHON, H.J., JACOB, C.O., SERRANO-RIOS, M., MARTINEZ, LARRAD, M.T., TENG, W.P., PARK, Y., ZHANG, Z.X., GOLDSTEIN, D.R., TAO, Y.W., BEAURAIN, G., BACH, J.F., HUANG, H.S., LUO, D.F., ZEIDLER, A., ROT-TER, J.I., YANG, M.C., MODILEVSKY, T., MACLAREN, N.K., SHE, J.X. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) isassociatedwith CTLA4 polymorphisms in multipleethnicgroups. *Hum Mol Genet*; 6: 1275-82. 1997.

MARTIN, P., YEAR CONSORTIUM, BIRAC CONSORTIUM, WILSON, A.G., MORGAN, A.W., EMERY, P., STEER, S., HOCKING, L.J., REID, D.M., HARRISON, P., WORDSWORTH, P., THOMSON, W., WORTHINGTON, J. : Identification of AF4/FMR2 family, member 3(AFF3) as a novel rheumatoid arthritis susceptibility *locus* and confirmation of two further pan-autoimmune susceptibility genes. *HumMol Genet*, 18:2518-2522 2009.

MARTIN, R. J. et al. Interleukin 18 promoter polymorphisms are not strongly associated with type I diabetes in a UK population. In: (Ed.). *Genes Immun*. England, v.6, 2005. p.171-4.

MASHIMO, T., LUCAS, M., SIMON-CHAZOTTES, D., FRENKIEL, M.P., MONTAGUTELLI, X., CECCALDI, P.E. et al.,Anonsense mutation in the gene encoding 2'–5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice. *ProcNatlAcadSciUSA*;99:11311–11316 2002.

MATHIEU, C., VAN ETEN, E., GYSEMANS, C., DECALLONNE, B., KATO, S., LAUREYS, J. et al., In vitro and in vivo analysis of the immune system of vitamin D receptor knockout mice. *J Bone Miner Res*;16:2057–2065. 2001.

MATHIEU, C., WAER, M., LAUREYS, J., RUTGEERTS, O., BOUILLON, R.

Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 di-hydroxyvitamin D3. *Diabetologia*;37:552–558. 1994.

MAUGENDRE, D., VERITE, F., GUILHEM, I., GENETET, B., ALLAN-NIC, H., DELAMAIRE, M. "Anti-pancreatic autoimmunity and Graves' disease: study of a cohort of 600 Caucasian patients, "European Journal of Endocrinology, vol. 137, no. 5, pp. 503–510, 1997.

MCCORMACK, R.M., MAXWELL, A.P., CARSON, D.J., PATTERSON, C.C., MIDDLETON, D., SAVAGE, D.A. The IL-12B 3'untranslated region DNA polymorphism is not associated with early-onset type 1 diabetes. *GenesImmun*;3:433–435. 2002.

MERRIMAN, T. R. Type 1 diabetes, the A1 milk hypothesis and vitamin D deficiency. *Diabetes research and clinical practice* v.83, p.149 – 156, 2009.

MIDDLEBROOK, A.J., LEBSACK, T., DELUCA, D. TNF-alpha mediated modulation of T cell development and exacerbation of in vitro T1DM in fetal thymus organ culture. *J Autoimmun*;29:134–45 2007.

MILLER M., RHYNE J., HAMLETTE S., BIRNBAUM J., RODRIGUEZ A., Genetics of HDL regulation in humans, *Curr. Opin. Lipidol.* 14 273–279. 2003.

MILLER, M. P. Alleles in space (AIS): computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *J Hered*, v. 96, n. 6, p. 722–4, Nov-Dec 2005.

MIREL, D.B., VALDES, A.M., LAZZERONI, L.C., REYNOLDS, R.L., ERLICH, H.A., NOBLE, J.A. Association of IL4R haplotypes with type 1 diabetes. *Diabetes*;51:3336–3341. 2002.

MOHR, S.B., GARLAND, C.F., GORHAM, E.D., GARLAND, F.C. The association between ultraviolet B irradiance, vitamin D status and incidence

rates of type 1 diabetes in 51 regions worldwide. *Diabetologia*;51:1391–1398. 2008.

MOJTAHEDI, Z. et al. Association of IL-18 promoter polymorphisms with predisposition to Type 1 diabetes. In: (Ed.). *Diabet Med. England*, v.23, 2006. p.235-9.

MORAHAN, G., BOUTLIS, C.S., HUANG, D., PAIN, A., SAUNDERS, J.R., HOBBS, M.R. et al., A promoter polymorphism in the gene encoding interleukin-12 p40 (IL-12B) is associated with mortality from cerebral malaria and with reduced nitric oxide production. *Genes Immun*;3:414–418 2002.

MORAHAN, G., HUANG, D., WU, M., HOLT, B.J., WHITE, G.P., KENDALL, G.E. et al., Association of IL-12B promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children. *Lancet*;360:455–459. 2002.

MORAHAN, G., HUANG, D., YMER, S.I., CANCELLA, M.R., STEPHEN, K., DABADGHAO, P. et al., Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility *locus* with a regulatory IL-12B allele. *Nat Genet*;27:218–221 2001.

MORAHAN, G., KAUR, G., SINGH, M., RAPTHAP, C.C., KUMAR, N., KATOCH, K. et al., Association of variants in the IL-12B gene with leprosy and tuberculosis. *Tissue Antigens*;69 (Suppl 1):234–236. 2007.

MÜLLER-BERGHAUS, J., KEMPER, M.J., HOPPE, B., QUERFELD, U., MÜLLER-WIEFEL, D.E., MORAHAN, G. et al., The clinical course of steroid-sensitive childhood nephrotic syndrome is associated with a functional IL-12B promoter polymorphism. *Nephrol Dial Transplant* Jul 15;23:3841–3844 2008.

NAKAHIRA, M. et al. Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator

protein 1. *J Immunol*, v. 168, n. 3, p. 1146-53, Feb 1 2002.

NAKANISHI, K. et al. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 12, n. 1, p. 53-72, Mar 2001.

NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J Mol Evol*, v. 19, n. 2, p. 153-70, 1983.

NEJENTSEV, S., COOPER, J.D., GODFREY, L., HOWSON, J.M., RANCE, H., NUTLAND, S. et al., Analysis of the vitamin D receptor gene sequence variants in type 1 diabetes. *Diabetes*;53:2709–2712 2004.

NEJENTSEV, S., HOWSON, J.M., WALKER, N.M., SZESZKO, J., FIELD, S.F., STEVENS, H.E. et al., Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature*;450 (7171):887–892. 2007.

NICOLETTI, F. et al. Serum levels of the interferon-gamma-inducing cytokine interleukin-18 are increased in individuals at high risk of developing type 1 diabetes. *Diabetologia*, v. 44, n. 3, p. 309-11, Mar 2001.

NIELSEN EM, HANSEN L, CARSTENSEN B, ECHWALD SM, DRIVSHOLM T et al., The E23K variant of Kir6.2 associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes*.;52:573–577. 2003.

NISTICO, L., BUZZETTI, R., PRITCHARD, L.E., VAN DER AUWERA, B., GIOVANNINIC, BOSI, E., LARRAD, M.T., RIOS, M.S., CHOW, C.C., COCKRAM, C.S., JACOBS, K, MIJOVIC, C., BAIN, S.C., BARNETT, A.H., VANDEWALLE, C.L., SCHUIT, F., GORUSFK, TOSI, R., POZZILLI, P., TODD, J.A. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum Mol*

Genet; 5: 1075-80. 1996.

NISTICO, L., GIORGI, G., GIORDANO, M., GALGANI, A., PETRONE, A., D'ALFONSO, S. et al., IL-12B polymorphism and type 1 diabetes in the Italian population: a case-control study. *Diabetes*;51:1649–1650 2002.

NOBLE, J.A., VALDES, A.M., BUGAWAN, T.L., APPLE, R.J., THOMSON, G., ERLICH, H.A. The HLA class I A *locus* affects susceptibility to type 1 diabetes. *Hum Immunol*;63:657–664 2002.

NOBLE, J.A., VALDES, A.M., LANE, J.A., GREEN, A.E., ERLICH, H.A. Linkage disequilibrium with predisposing DR3haplotypes accounts for apparent effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin- α polymorphismson type 1 diabetes susceptibility. *Hum Immunol*;67:999–1002. 2006.

NOBLE, J.A., WHITE, A.M., LAZZERONI, L.C., VALDES, A.M., MIREL, D.B., REYNOLDS, R. et al., A polymorphism in the *TCF7* gene, C883A, is associated with type 1 diabetes. *Diabetes*;52:1579–1582. 2003.

NOVOTA, P. et al. Interleukin IL-18 gene promoter polymorphisms in adult patients with type 1 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes in adults. In: (Ed.). *Immunol Lett. Netherlands*, v.96, 2005. p.247-51.

OKADA, H. et al. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol*, v. 160, n. 1, p. 1-9, Apr 2010.

OKRUSZKO, A., SZEPIETOWSKA, B., WAWRUSIEWICZ-KURYLONEK, N., GÓRSKA, M., et. al. HLA-DR, HLA-DQB1 and PTPN22 gene polymorphism:association with age at onset for autoimmune diabetes. *Arch Med Sci* 8, 5: 874-878 . 2013.

OLIVEIRA, C. M. B. D. et al. Cytokines and pain. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, v. 61, n. 2, p. 260-265, 04/2011 2011.

ONENGUT-GUMUSCU, S., BUCKNER, J.H., CONCANNON, P. A haplotype-based analysis of the PTPN22 locus in type 1 diabetes. *Diabetes*;55:2883–2889. 2006.

OWERBACH, D., NAYA, F.J., TSAI, M.J., ALLANDER, S.V., POWELL, D.R., GABBAYKH. Analysis of candidate genes for susceptibility to type 1 diabetes: a case-control and family-association study of genes on chromosome 2q31–35. *Diabetes*; 46: 1069–74. 1997.

PALMER, J. P. et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*, v. 222, n. 4630, p. 1337–9, Dec 23 1983.

PALMER, J.P., FLEMING, G.A., GREENBAUM, C.J., HEROLD, K.C., JANSÁ, L.D., KOLB, H., *et al.*, C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta cell function – ADA Workshop Report. *Diabetes*. v.53, p.250–64, 2004.

PAN, H. F.; LENG, R. X.; YE, D. Q. Lack of association of interleukin-18 gene promoter -607 A/C polymorphism with susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. In: (Ed.). *Lupus*. England, v.20, 2011. p.945–51.

PANI, M.A., KNAPP, M., DONNER, H., BRAUN, J., BAUR, M.P., USADEL, K.H. et al., Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to IDDM in Germans. *Diabetes*;49:504–507. 2000.

PASCHOU, P., BOZAS, E., DOKOPOULOU, M., HAVARANI, B., MALAMITSI-PUCHNER, A., YLLI, Z., YLLI, A., THYMELLI, I., GERASIMIDI-VAZEOU, A., BARTSOCAS, S. C., HLA alleles and type 1 diabetes mellitus in low disease incidence populations of southern Europe: a comparison of Greeks and Albanians. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 17:173–182. 2004.

PASSERINI, L., ALLAN, S.E., BATTAGLIA, M., DI NUNZIO, S., ALSTAD,

A.N., LEVINGS, M.K., RONCAROLO, M.G., BACCHETTA, R. STAT5-signaling cytokines regulate the expression of FOXP3 in CD4+CD25+ regulatory T cells and CD4+CD25-effector T cells. *Int Immunol*;20:421–431 2008.

PENA, S. D. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011.

PENG, J.C., ABU BAKAR, S., RICHARDSON, M.M., JONSSON, J.J., FRAZER, I.H., NIELSEN, L.K. et al., IL10 and IL-12B polymorphisms each influence IL-12p70 secretion by dendritic cells in response to LPS. *ImmunolCell Biol*;84:227–232. 2006.

PODOLSKY R, PRASAD MV;LINGA-REDDY, SHE J-X, TYPE I DIABETES GENETICS CONSORTIUM. Analyses of multiple single-nucleotide polymorphisms in the SUMO4/IDDM5 region in affected sib-pair families with type I diabetes. *Genes Immun*. December ; 10(Suppl 1): S16–S20. 2009.

PRICE, P., WONG, A.M.L., WILLIAMSON, D.W. et al., Polymorphism at positions -22 and -348 in the promoter of the BAT1 gene affect transcription and the binding of nuclear factors. *Hum Mol Genet*;13:967–974. 2004.

QU, H., BHARAJ, B., LIU, X.Q., CURTIS, J.A., NEWHOOK, L.A., PATERSON, A.D. et al., Assessing the validity of the association between the SUMO4 M55V variant and risk of type 1 diabetes. *Nat Genet*;37:111–112. 2005.

QU, H., TESSIER, M.C., HUDSON, T.J., POLYCHRONAKOS, C. Confirmation of the association of the R620W polymorphism in the protein tyrosine phosphatase PTPN22 with type 1 diabetes in a family based study. *J Med Genet* 42:266–270. 2005.

QU, H.Q., GRANT, S.F., BRADFELD, J.P., KIM, C., FRACKELTON, E., HAKONARSON, H. et al., Association of RASGRP1 with type 1 diabetes is revealed by combined follow-up of two genome-wide studies. *J Med Genet*;46:553–554. 2009.

QU, H.Q., MONTPETIT, A., GE, B., HUDSON, T.J., POLYCHRONAKOS, C. Toward further mapping of the association between the *IL2RA locus* and type 1 diabetes. *Diabetes*;56:1174–1176. 2007.

RABIN, D. U. et al. Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J Immunol*, v. 152, n. 6, p. 3183-8, Mar 15 1994.

RABINOVITCH, A., SUAREZ-PINZON, W.L. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol*;55:1139–49. 1998.

RICH, S.S., CONCANNON, P., ERLICH, H., JULIER, C., MORAHAN, G., NERUP, J. et al., The Type 1 Diabetes Genetics Consortium. *Ann N Y Acad Sci*;1079:1–8. 2006.

RACHMIEL, M. et al. TH1/TH2 cytokine balance in patients with both type 1 diabetes mellitus and asthma. In: (Ed.). *Cytokine*. United States, v.34, 2006. p.170-6.

ROOSE, J., HULS, G., VAN BEEST, M., MOERER, P., VAN DER HORN, K., GOLDSCHMEDING, R. et al., Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science*;285:1923–1926 1999.

ROSOLOWSKY, E.T., SKUPIEN, J., SMILES, A.M., NIEWEZAS, M., ROSHAN, B., et al. Risk for ESRD in type 1 diabetes remains high despite renoprotection. *J Am Soc Nephrol* 22: 545-553. 2011.

ROTHER, H. et al. Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J Clin Invest*, v. 99, n. 3, p. 469-74, Feb 1 1997.

RSTUDIO. Disponível em: <<http://rstudio.org>>. Acesso em: 10 mai. 2012.

RUDOFISKY, G., SCHLOTTERER, A., HUMPERT, P.M., TAFEL, J., MORCOS, M., NAWROTH, P.P. et al., A M55V polymorphism in the SUMO4 gene is associated with a reduced prevalence of diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*;116:211–214 2008.

RUST S., ROSIER M., FUNKE H., REAL J., AMOURA Z., PIETTE J. C., DELEUZE J. F., BREWER H. B., DUVERGER N., DENEFLÉ P. et al., Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet.* 22: 352–355. 1999.

SANDHOLM. N. et. al. New Susceptibility Loci Associated with Kidney Disease in Type 1 Diabetes, *PLOS Genetics*. 8. 9. 2012

SANTIAGO, J.L., MARTÍNEZ, A., DE LA CALLE, H., FERNÁNDEZ-ARQUERO, M., DE LA CONCHA, E.G., URCELAY, E. Th1 cytokine polymorphisms in Spanish patients with type 1 diabetes. *Hum Immunol*;66 :897–902 2005.

SCREENAN RRY, N.A., TSAI, E.B., PALMER, J.P., HEROLD, K.C. Natural history of beta cell function in type 1 diabetes. *Diabetes*. v.54:Suppl 2:S32-9, 2005.

SCREENAN, S., PICK, A.J., LEVISETTIM, BALDWIN, A.C., PUGH, W., POLONSKY, K.S. Increased beta-cell proliferation and reduced mass before diabetes onset in the nonobese diabetic mouse. *Diabetes*. v.48, p.989-96, 1998.

SHAM, P. C., AND CURTIS, D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic *loci*. *Annals Hum Genetics*, v. 59, p.97-105, 1995.

SHE, J.X. Susceptibility to type 1 diabetes: HLA-DQ and DR revisited. *Immunol. Today* 17:323–329. 1996.

SHIBUYA, A., CAMPBELL, D., HANNUM, C., YSSEL, H., FRANZ-BACON, K., MCCLANAHAN, T., KITAMURA, T., NICHOLL, J., SUTHERLAND, G., LANIER, L. : DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity*, 4:573-581. 1996.

SMYTH, D., COOPER, J.D., COLLINS, J.E., HEWARD, J.M., FRANKLYN, J.A., HOWSON, J.M. et al., Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase *locus* (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity *locus*. *Diabetes*;53:3020–3023. 2004.

SMYTH, D.J., COOPER, J.D., BAILEY, R., FIELD, S., BURREN, O., SMINK, L.J et al., A genome-wide association study of non synonymous SNPs identifies a type 1 diabetes *locus* in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat Genet*;38:617–619. 2006.

SMYTH, D.J., COOPER, J.D., HOWSON, J.M., WALKER, N.M., PLAGNOL, V., STEVENS, H. et al., PTPN22 Trp620 explains the association of chromosome 1p13 with type 1 diabetes and shows a statistical interaction with HLA class II genotypes. *Diabetes*;57:1730–1737. 2008.

SMYTH, D.J., COOPER, J.D., LOWE, C.E., NUTLAND, S., WALKER, N.M., CLAYTON, D.G. et al., No evidence for association of OAS1 with type 1 diabetes in unaffected siblings or type 1 diabetic cases. *Diabetes*;55:1525–1528. 2006.

SMYTH, D.J., HOWSON, J.M., LOWE, C.E., WALKER, N.M., LAM, A.C., NUTLAND, S. et al., Assessing the validity of the association between the SUMO4 M55V variant and risk of type 1 diabetes. *Nat Genet*;37:110–111. 2005.

SMYTH, D.J., PLAGNOL, V., WALKER, N.M., COOPER, J.D., DOWNES, K., YANG, J.H., HOWSON, J.M., STEVENS, H., MCMANUS, R., WIJMEGA, C., HEAP, G.A., DUBOIS, P.C., CLAYTON, D.G., HUNT, K.A., VAN HEEL, D.A., TODD, J.A. :Sharedanddistinctgeneticvariants in type 1 diabetes andceliacdisease. *N Engl J Med* 359:2767–2777 2008.

STAYOUSSEF, M., AL-JENAIDI, F.A., AL-ABBASI, A., AL-OLA, K., KHAYYAT, H., MAHJOUB, T. et al., Modulation of type 1 diabetes susceptibility by TNF α -308G/A and lymphotoxin α +249A/G haplotypes in Bahraini patients: Lack of linkage disequilibrium with predisposing DQB1-DRB1 haplotypes. *ClinVaccineImmunol*; 15:379–81. 2008.

STAYOUSSEF, M., BENMANSOUR, J., AL-JENAIDI, F.A., NEMR, R., ALI, M., E., MAHJOUB, T., ALMAWI, W.Y. Influence of common and specific HLA-DRB1/DQB1 haplotypes on genetic susceptibilities of three distinct Arab populations to type 1 diabetes. *Clin. Vaccine Immunol.* 16:136–138. 2009.

STECK, A.K., LIU, S.Y., MCFANN, K., BARRIGA, K.J., BABU, S.R., EISENBARTH, G.S. et al., Association of the PTPN22/LYP gene with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 7:274–278. 2006.

STEENKISTE, A., VALDES, A.M., FEOLO, M., HOFFMAN, D., CONCANNON, P., NOBLE, J., SCHOCH, G., HANSEN, J., HELMBERG, W., DORMAN, J.S., THOMSON, G., PUGLIESE, A. 13 TH IHWS 1 DIABETES COMPONENT PARTICIPATING INVESTIGATORS. 14TH INTERNATIONAL HLA AND IMMUNOGENETICSWORKSHOP: report on the HLA component of type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 69(Suppl. 1):214–225. 2007.

STEFFES, M.W., SIBLEY, S., JACKSON, M., THOMAS, W. b-cell Function and the development of diabetes-related complications in diabetes control and complication trial. *Diabetes Care*. v.26, p.832-6, 2003.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*, v. 68, n. 4, p. 978-89, Apr 2001.

STEPHENS, M.; SCHEET, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet*, v. 76, n. 3, p. 449-62, Mar 2005.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, v. 299, n. 6710, p. 1259-60, Nov 18 1989.

SZESZKO, J. S. et al. Analysis of polymorphisms of the interleukin-18 gene in type 1 diabetes and Hardy-Weinberg equilibrium testing. In: (Ed.). *Diabetes*. United States, v.55, 2006. p.559-62.

TAKAHASHI, K., SATOH, J., SEINO, H., ZHU, X.P., SAGARA, M., MASUDA, T. et al., Prevention of type I diabetes with lymphotoxin in BB rats. *ClinImmunolImmunopathol* 69:318–23. 1993.

TAM CH, MA RC, SO WY, WANG Y, LAM VK, GERMER S, MARTIN M, CHAN JC, NG MC. Interaction effect of genetic polymorphisms in glucokinase (GCK) and glucokinase regulatory protein (GCKR) on metabolic traits in healthy Chinese adults and adolescents. *Diabetes*.;58:765–769. doi: 10.2337/db08-1277. 2009.

TANIYAMA, M., KASUGA, A., NAGAYAMA, C., ITO, K., Occurrence of Type 1 Diabetes in Graves' Disease Patients Who Are Positive for Antiglutamic Acid Decarboxylase Antibodies: An 8-Year Follow up Study *Journal of Thyroid Research* Volume, Article ID 306487, 4 2011.

TARN, A.C., THOMAS, J.M. "Predicting insulin-dependent diabetes," *The Lancet*, vol. 1, no. 8590, pp.845–850, 1988.

TAVARES, N. A. *et al.* Interleukin 18 (IL-18) gene promoter polymorphisms are associated with type 1 diabetes mellitus in Brazilian patients. *Cytokine*, v. 62, n. 2, p. 286-9, May 2013.

TEMAJO, N.O., HOWARD, N. The co-operative specificity theory: phenotypic protection from T1D by certain HLA class II DRB1 and DQ alleles identifies the absence of co-operation between the respective DR and DQ molecules eventuating in no T1D-predisposition. *Autoimmun. Rev.*8:364–368. 2009.

TESSIER, M.C., QU, H.Q., FRECHETTE, R., BACOT, F., GRABS, R., TABACK, S.P. *et al.*, Type 1 diabetes and the OAS gene cluster: association with splicing polymorphism or haplotype? *J Med Genet*; 43 :129–132 2006.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: the effect of intensive therapy on residual beta-cell function in patients with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial. *Ann Intern Med.* v.128, p.517-53, 1998.

THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM, Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*;401:921–923. 1999.

TODD, J.A., BELL, J.I., MCDEVITT, H.O. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*;329:599–604. 1987.

TODD, J.A., WALKER, N.M., COOPER, J.D., SMYTH, D.J., DOWNES, K., PLAGNOL, V., BAILEY, R., NEJENTSEV, S., FIELD, S.F., PAYNE, F., LOWE,

C.E., SZESZKO, J.S., HAFER, J.P., ZEITELSL, YANG, J.H., VELLA, A., NUTLAND, S., STEVENS, H.E., SCHUILENBURG, H., COLEMAN, G., MAISURIA, M., MEADOWS, W., SMINK, L.J., HEALY, B., BURREN, O.S., LAM, A.A., OVINGTONNR, ALLEN, J., ADLEM, E., LEUNG, H.T., WALLACE, C., HOWSON, J.M., GUJA, C., IONESCU-TÎRGOVIS, T.E.C., GENETICS OF TYPE 1 DIABETES IN FINLAND, SIMMONDS M.J., HEWARD, J.M., GOUGH, S.C., WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM, DUNGER, D.B., WICKER, L.S., CLAYTON, D.G. Robust association of four new chromosomal regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet*; 39:857–864 2007.

TSAI, E.B., SHERRY, N.A., PALMER, J.P., HEROLD, K.C., for the DPT-1 Study Group. The Rise and Fall of Insulin Secretion in type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia*. v.49, p.261-70, 2006.

TSUNEMI, Y., SAEKI, H., NAKAMURA, K., SEKIYA, T., HIRAI, K., FUJITA, H. et al., Interleukin-12 p40 gene (IL-12B) 3'-untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci*; 30:161–166. 2002.

TSURUMARU, M., KAWASAKI, E., IDA, H., MIGITA, K., MORIUCHI, A., FUKUSHIMA, K. Evidence for the role of small ubiquitin-like modifier 4 as a general autoimmunity *locus* in the Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab*; 91:3138–3143. 2006.

TUOMI, T., GROOP, L.C., ZIMMET, P.Z., ROWLEY, M.J., KNOWLES, W., MACKAY, I.R. "Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease," *Diabetes*, vol. 42, no. 2, pp. 359–362, 1993.

UEDA, H., HOWSON, J.M., ESPOSITO, L., HEWARD, J., SNOOK, H., CHAMBERLAIN, G. et al., Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*; 423:506–511 2003.

VAARALA, O. Is it dietary insulin? *Ann N Y AcadSci.* v.1079, p.350–9, 2006.

VALDES, A.M., THOMSON, G. DIABETES GENETICS CONSORTIUM. Several *loci* in the HLA class III region are associated with T1D risk after adjusting for DRB1-DQB1. *Diabetes Obes Metab*;11(Suppl 1):46–52. 2009.

VALDES, A.M., WAPELHORST, B., CONCANNON, P., ERLICH, H.A., THOMSON, G., NOBLE, J.A. Extended DR3-D6S273-HLA-B haplotypes are associated with increased susceptibility to type 1 diabetes in US Caucasians. *Tissue Antigens*;65:115–119. 2005.

VAN ETEN, E., VERLINDEN, L., GIULIETTI, A., RAMOS-LOPEZ, E., BRANISTEANU, D.D., FERREIRA, G.B. et al., The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *Eur J Immunol*;37:395–405 2007.

VANG, T., CONGIA, M., MACIS, M.D., MUSUMECI, L., ORRU, V., ZAVATTARI, P. et al., Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet*;37:1317–1319 2005.

VANG, T., MILETIC, A. V., BOTTINI, N., MUSTELIN, T. Protein tyrosine phosphatase PTPN22 in human autoimmunity. *Autoimmunity* **40** (6): 453–461. 2007.

VAUX, D.L., FLAVELL, R.A. Apoptosis genes and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*;12:719–24 2000.

VELAGA, M.R., WILSON, V., JENNINGS, C.E., OWEN, C.J., HERINGTON, S., DONALDSON, P.T. et al., The codon 620tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. *J ClinEndocrinolMetab*; 89:5862–5865. 2004.

VELLA, A., COOPER, J.D., LOWE, C.E., WALKER, N., NUTLAND, S., WIDMER, B. et al., Localization of a type 1 diabetes *locus* in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet*;76:773–779. 2005.

VINIK, A.I., MASER, R.E., MITCHELL, B.D., FREEMAN, R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care*. 26 (5), p.1553-79, 2003.

WALLACE, C., SMYTH, D.J., MAISURIA-ARMER, M., WALKER, N.M., TODD, J.A., CLAYTON, D.G. The imprinted DLK1-MEG3 gene region on chromosome 14q32.2 alters susceptibility to type 1 diabetes. *NatGenet* 42:68–71 2009.

WALUNAS, T.L., BAKKER, C.Y., BLUESTONE, J.A. CTLA4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med*; 183: 2541-50. 1996.

WANG. C.Y., SHE, J.X. SUMO4 and its role in type 1 diabetes pathogenesis. *Diabetes Metab Res Rev*;24:93–102. 2008.

WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM: GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM: Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447:661–678, 2007.

WILLER CJ, SANNA S, JACKSON AU, SCUTERI A, BONNYCASTLE LL, CLARKE R, HEATH SC, TIMPSON NJ, NAJJAR SS, STRINGHAM HM, STRAIT J, DUREN WL, MASCHIO A, BUSONERO F, MULAS A, ALBAI G, SWIFT AJ, MORKEN MA, NARISU N, BENNETT D, PARISH S, SHEN H, GALAN P, MENETON P, HERCBERG S, ZELENKA D, CHEN WM, LI Y, SCOTT LJ, SCHEET PA. *et al.*, Newly identified *loci* that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet*.;40:161–169.

doi: 10.1038/ng.76. 2008.

WINDSOR, L. et al. Alleles of the IL-12B 3'UTR associate with late onset of type 1 diabetes. *Hum Immunol*, v. 65, n. 12, p. 1432-6, Dec 2004.

WONG, A.M.L., ALLCOCK, R.J.N., CHEONG, K.Y.M., CHRISTIANSEN, F.T., PRICE, P. Alleles of the proximal promoter of BAT1, a putative anti-inflammatory gene adjacent to the TNF cluster, reduce transcription on a disease-associated MHC haplotype. *Genes Cells*;8:403–412. 2003.

YANAGAWA, T., MARUYAMA, T., GOMI, K., TANIYAMA, M., KASUGA, A., OZAWAY, TERAUCHI, M., HIROSE, H., MARUYAMA, H., SARUTA, T. Lack of association between CTLA-4 gene polymorphism and IDDM in Japanese subjects. *Autoimmunity*; 29: 53-6. 1999.

YANAGAWA, T., TANIYAMA, M., ENOMOTO, S., GOMI, K., MARUYAMA, H., BANY, SARUTA, T. CTLA4 gene polymorphism confers genetic susceptibility to Graves' disease in Japanese. *Thyroid*; 7: 843-6. 1997.

YANG, J.M., NAGASAKA, S., YATAGAI, T., NAKAMURA, T., KUSAKA, I., ISHIKAWA, S.E. et al., Interleukin-12p40 gene(IL-12B) polymorphism and Type 1 diabetes mellitus in Japanese: possible role in subjects without having high-risk HLA haplotypes. *Diabetes Res Clin Pract*;71:164–169. 2006.

YANG, X.D., TISCH, R., SINGER, S.M., CAO, Z.A., LIBLAU, R.S., SCHREIBER, R.D. et al., Effect of tumor necrosis factor alpha on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the diabetogenic process. *J Exp Med*;180:995–1004 1994.

YMER, S.I., HUANG, D., PENNA, G., GREGORI, S., BRANSON, K., ADORINI, L. et al., Polymorphisms in the IL-12B gene affect structure and expression of IL-12 in NOD and other autoimmune-prone mouse strains. *GenesImmun*; 3:151–157. 2002.

YOO, Y., GAO, G., ZHANG, K. Case-control association analysis of rheumatoid arthritis with candidate genes using related cases. BMC Proc;1(Suppl 1):S33. 2007.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. Int Anesthesiol Clin, v. 45, n. 2, p. 27-37, Spring 2007.

ZHANG, L., GIANANI, R., NAKAYAMA, M. *et al.*, "Type 1 diabetes: chronic progressive autoimmune disease," Novartis Foundation Symposium, vol. 292, pp. 85–94, 2008.

ZHENG, W., SHE, J.X. Genetic association between a lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) and type1 diabetes. Diabetes;54:906–908. 2005.

ZHERNAKOVA, A., EERLIGH, P., WIJMENGA, C., BARRERA, P., ROEP, B.O., KOELEMAN, B.P. Differential association of the PTPN22 coding variant with autoimmune diseases in a Dutch population. Genes Immun;6:459–461. 2005.

Apêndices

APÊNDICE 1 – ARTIGO.....	134
APÊNDICE 2 – LISTA DE COORDENADAS GEOGRÁFICAS DOS CENTROS..	158
APÊNDICE 3 – DETALHES SOBRE O BOXPLOT.....	159

APÊNDICE 1 – ARTIGO

Polymorphism analyses of *IL-18* and *IL-12B* genes in a large sample group of patients with DM1 throughout Brazil.

Alejandro Boëchat-Fernandes¹, Rosângela R. Réa², Ana Cristina R. Almeida², Lupe Furtado-Alle¹ and Ricardo L. R. Souza¹

¹ Genetics Department, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

² Endocrinology and Metabolism Service, University Hospital of the Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

Correspondence to: Ricardo L R Souza, PO Box 19071, 81531-980, Genetics Department, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil. E-mail: ricardo.lehtonen@gmail.com

Abstract

Type 1 *diabetes mellitus* (DM1) is a modern day health issue. Diabetes was diagnosed significantly earlier (16) in patients with at least three minor alleles (IL-18 g.-137C/ g.-607A/IL -12B C), than in those without these alleles (25). The aim of this study was to investigate the effect of the polymorphisms in the SNPs in *IL-18* gene (rs187238, exon 1; rs1946518, exon 4) and the SNP of the *IL-12B* gene (rs3212227, 3'UTR) in DM1 onset. A total of 1244 patients with DM1 were genotyped. Results of dispersion, the allele and genotype frequencies with samples not being in Hardy-Weinberg, the data extracted by the differentiation test, all highlights the heterogeneity presented by the samples collected in the 13 centers. The median of age at diagnosis of DM1 was compared with each of the genotypes of the genes *IL-18* and *IL-12B* within each center. There is a significant difference in the center of Bauru by focusing on the genotypes for SNP rs187238 while there is a tendency to significance to the center of HC-RS when focused on SNP rs1946518. Comparisons with combination of genotypes grouped up in 27 groups, the centers of Bauru, Ceará and Cedebe showed a tendency to be statically significant. Our conclusions are: 1) It was not possible to merge the samples from different centers into a single representative sample, due to the differences between them; 2) Some centers, but not all, showed either significant or tendency to be significant when analyzed by SNPs in the *IL-18* gene, suggesting association with the disease.

Keywords: type 1 *diabetes mellitus*; *IL-18*; *IL-12B*, polymorphism analyses

Type 1 *diabetes mellitus* (DM1) results from destruction of insulin-producing beta cells of the pancreatic islets and includes cases resulting from autoimmune disease and from unknown etiology. DM1 corresponds to 5-10% of all cases of *diabetes mellitus* in South America, North America and Europe (Diagnosis and classification of *diabetes mellitus*, 2013)Sociedade Brasileira de Diabetes, 2014).

In the majority of the complex diseases, including *Diabetes mellitus*, there are ambiental and genetic causal factors. The better understanding of the mechanism underlying the predisposition of any disease is of great value. The genes analyzed in the present study, e.g. IL-18 and IL-12B, already have been associated with diabetes within many different populations and one more incisive study in one large sample in a Brazilian population will elucidate their participation in the predisposition and evolution of the disease, as such genes were given conflicting results in the literature within different populations.

It has been shown that IL-18 acts in synergy with IL-12 in enhancing IFN- γ mRNA transcription and that IL-12 upregulates IL-18 receptor expression on target cells, T lymphocytes and NK cells (Takeda *et al.*, 1998; Yoshimoto *et al.*, 1998; Morahan *et al.*, 2001). IL-12 drives the differentiation of lymphocytes towards auto reactive T cell responses, thus increasing susceptibility to autoimmunity. Moreover, activated macrophages and B cells express IL-12 p40 polypeptide subunit (coded by IL-12B gene), and its expression may be upregulated by IFN- γ (Huang *et al.*, 2000). Several polymorphisms have been identified within IL-12B gene. SNP rs321227 (A/C) showed strong association with DM1 susceptibility in some, but not all studies (Morahan *et al.*, 2001; Nerup and Pociot, 2001). Caucasian American families (Davoodi-Semiromi *et al.*, 2002), Western Australian (Windsor *et al.*, 2004) and

Japanese subjects (Yang *et al.*, 2006), reported a association between that polymorphism and susceptibility to the DM1.

Among numerous cytokines, interleukin-18 (IL-18) is a unique cytokine that enhances both Th1 and Th2 derived immune responses (Nakanishi *et al.*, 2001). IL-18 contributes to the pathogenesis of DM1 acting as a pro inflammatory cytokine and, in synergy with interleukin-12 (IL-12), promotes development of Th1 lymphocyte response. By induction of gamma-interferon (IFN- γ) production, modulates activity of NK cells, increases TNF-alpha (TNF- α) and IL-1 production by macrophages, up regulates the expression of adhesion molecules, and induces nitric oxide production in the area of chronic inflammation (McInnes *et al.*, 2000; Nakahira *et al.*, 2002). Rise in IL-18 precedes development of the acute phase of autoimmune diseases like diabetes (Rothe *et al.*, 1997).

Diabetes was diagnosed significantly earlier (at 16 years of age) in patients with at least three minor alleles (IL-18 g.-137C/ g.-607A/IL -12B C), than in those without these alleles (at 25 years of age) (Hadzija *et al.*, 2013). It seems that the difference of age at onset of disease could not only be attributed to alleles at a single locus, suggesting that both genes could contribute to the variability of age. It further concurs with the fact that genetic factors might regulate the intensity of beta cell destruction and therefore influence the age of diabetes onset (Sabbah *et al.*, 2000).

Material and Methods

The present study examined three SNPs located two at the gene *IL-18* and one at *IL-12B* on a sample of 1244 patients with DM1 collected throughout 13 diabetes centers scattered in various regions of Brazil, aiming to evaluate their effect on DM1 onset and associations with clinical data.

Only patients with a clear diagnosis of DM1 at disease onset were included, with plasma glucose levels exceeding 200 mg/dl on more than one occasion, overt symptoms and signs of the disease and immediate insulin requirement.

DNA of the DM1 samples were extracted by a salting out method (Lahiri and Nurnberger, 1991) and genotyped, by TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystem), for two variants of the *IL-18* gene (rs187238, exon 1) and (rs1946518, exon 4), and one other SNP of the *IL-12B* gene (rs3212227, 3'UTR). The reactions were performed on the ViiA7 Real Time PCR System apparatus with the following protocol: 1) 50° C for 2 minutes; 2) 95° C for 10 minutes; 3) 95° C for 15 seconds, 4) 62° C for 1 minute (steps 3 and 4 were repeated 50 times).

The R program (www.rstudio.org) with aid of the package genetics was used to compare allele and genotype frequencies with χ^2 test. With the package nortest, the test of normality. With the package Stats, the comparison between medians. Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) was used to do the differentiation test. With the program Alleles in Space (Miller, 2005) the genetic difference using the coordinates of each center was calculated.

Results and Discussion

The genotypic and allelic frequencies of the SNPs rs187238 and rs1946518 for the gene *IL-18* and rs3212227 for *IL-12B* where calculated for each center and can be seen in table 1.

Table 1. Allele and genotype frequencies of the SNPs rs187238 and rs1946518 for the gene *IL-18* and rs3212227 for *IL-12B* from patients with DM1 in each center.

Centers		Bauru		UFRJ		UERJ		CIDH		Brasília	
SNPs	Alleles	1		2		3		4		5	
	Genotypes	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)
rs187238	G	138	58.97	51	72.86	129	67.89	112	72.73	195	68.18
	C	96	41.03	19	27.14	61	32.11	42	27.27	91	31.82
IL 18	GG	45	38.46	20	57.14	42	44.21	39	50.65	76	53.15
	GC	48	41.03	11	31.43	45	47.37	34	44.16	43	30.07
	CC	24	20.51	4	11.43	8	8.42	4	5.19	24	16.78
HW	X ² (p)	2,7094 (0,1204)		1,4761 (0,2023)		0,7115 (0,3472)		0,9849 (0,3998)		13,4741 (0,0003)	
rs1946518	C	123	52.56	42	56.76	97	56.40	87	55.77	142	52.21
	A	111	47.44	32	43.24	75	43.60	69	44.23	130	47.79
IL 18	CC	32	27.35	13	35.14	27	31.40	20	25.64	40	29.41
	CA	59	50.43	16	43.24	43	50.00	47	60.26	62	45.59
	AA	26	22.22	8	21.62	16	18.60	11	14.10	34	25.00
HW	X ² (p)	0,0147 (0,8557)		0,5244 (0,523)		0,0238 (0,8246)		3,823 (0,051)		1,0166 (0,3911)	
rs3212227	A	189	80.08	49	70.00	138	73.40	56	59.57	195	70.65
	C	47	19.92	21	30.00	50	26.60	38	40.43	81	29.35
IL 12B	AA	74	62.71	17	48.57	50	53.19	18	38.30	70	50.72
	AC	41	34.75	15	42.86	38	40.43	20	42.55	55	39.86
	CC	3	2.54	3	8.57	6	6.38	9	19.15	13	9.42
HW	X ² (p)	0,9404 (0,2446)		0,0146 (1)		0,1175 (0,7919)		0,6383 (0,5531)		0,2092 (0,6759)	

Centers		FMUSP		Belém		HC-RS		Ceara		CEDEBA	
SNPs	Alleles	6		7		8		9		10	
	Genotypes	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)
rs187238	G	145	64.16	44	61.11	154	66.96	48	66.67	227	76.69
	C	81	35.84	28	38.89	76	33.04	24	33.33	69	23.31
IL 18	GG	48	42.48	13	36.11	51	44.35	15	41.67	94	63.51
	GC	49	43.36	18	50.00	52	45.22	18	50.00	39	26.35
	CC	16	14.16	5	13.89	12	10.43	3	8.33	15	10.14
HW	X ² (p)	0,3688 (0,542)		0,0971 (1)		0,055 (0,8364)		0,5625 (0,7089)		10,2352 (0,0028)	
rs1946518	C	137	64.62	39	52.70	155	53.45	53	58.89	191	64.53
	A	75	35.38	35	47.30	135	46.55	37	41.11	105	35.47
IL 18	CC	46	43.40	11	29.73	49	33.79	14	31.11	54	36.49
	CA	45	42.45	17	45.95	57	39.31	25	55.56	83	56.08
	AA	15	14.15	9	24.32	39	26.90	6	13.33	11	7.43
HW	X ² (p)	0,5424 (0,5198)		0,2274 (0,7372)		6,3967 (0,0122)		0,9774 (0,3605)		7,4946 (0,0038)	
rs3212227	A	188	68.12	32	59.26	195	68.66	57	66.28	200	67.57
	C	88	31.88	22	40.74	89	31.34	29	33.72	96	32.43
IL 12B	AA	62	44.93	11	40.74	64	45.07	21	48.84	59	39.86
	AC	64	46.38	10	37.04	67	47.18	15	34.88	82	55.41
	CC	12	8.70	6	22.22	11	7.75	7	16.28	7	4.73
HW	X ² (p)	0,6325 (0,4369)		1,4652 (0,2578)		1,3196 (0,2511)		2,0737 (0,165)		10,328 (0,00089)	

Centers		Curitiba		UNIFESP		Campinas	
SNPs	Alleles	11		12		13	
	Genotypes	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)
rs187238	G	72	63.16	78	65.00	93	67.39
	C	42	36.84	42	35.00	45	32.61
IL18	GG	23	40.35	28	46.67	29	42.03
	GC	26	45.61	22	36.67	35	50.72
	CC	8	14.04	10	16.67	5	7.25
HW	X ² (p)	0,0224 (1)		2,2614 (0,1631)		1,639 (0,1645)	
rs1946518	C	50	50.00	63	51.64	74	52.86
	A	50	50.00	59	48.36	66	47.14
IL18	CC	11	22.00	20	32.79	21	30.00
	CA	28	56.00	23	37.70	32	45.71
	AA	11	22.00	18	29.51	17	24.29
HW	X ² (p)	0,72 (0,5759)		3,6642 (0,06989)		0,479 (0,6315)	
rs3212227	A	10	71.43	80	66.67	109	76.76
	C	4	28.57	40	33.33	33	23.24
IL12B	AA	3	42.86	24	40.00	41	57.75
	AC	4	57.14	32	53.33	27	38.03
	CC	0	0.00	4	6.67	3	4.23
HW	X ² (p)	1,12 (0,5211)		2,4 (0,1592)		0,3082 (0,4951)	

Some genotypes within the samples were not in Hardy-Weinberg equilibrium (in bold in Table 1). For SNP rs187238 in the center of Brasilia, for rs1946518 in HC-RS center. For Cedeba center, the sample was not in Hardy-Weinberg equilibrium for all SNPs.

The exact differentiation between samples of each center based on genotype frequencies are in Table 2. The UFRJ proved to be the most similar compared to samples of the other centers which is similar to 10 others and only different in comparison with two (CIDH and Curitiba). While the center of Curitiba, on the other hand, is the most different of all the centers, being similar to no other center.

Table 2. Exact test of differentiation between samples for each test center based on genotype frequencies.

	UERJ	UFRJ	UNIFESP	FMUSP	Campinas	Bauru	HC-RS	Curitiba	Belém	Ceara	CIDH	CEDEBA	Brasília
UERJ	=====	0.20471	0.00152	0.00205	0.00261	0.00054	0.00020	0.00000	0.12882	0.05262	0.00001	0.00001	0.00000
UFRJ	-	=====	0.11659	0.20108	0.15980	0.36530	0.18899	0.00000	0.05829	0.73408	0.01672	0.05398	0.13332
UNIFESP	+	-	=====	0.00595	0.02295	0.02352	0.10807	0.00000	0.04371	0.06351	0.00000	0.00170	0.02334
FMUSP	+	-	+	=====	0.00107	0.00004	0.00200	0.00000	0.00336	0.08145	0.00000	0.00000	0.00000
Campinas	+	-	+	+	=====	0.78198	0.10210	0.00000	0.00249	0.32513	0.00000	0.00009	0.00713
Bauru	+	-	+	+	-	=====	0.00018	0.00000	0.00000	0.06639	0.00000	0.00000	0.00171
HC-RS	+	-	-	+	-	+	=====	0.00000	0.00255	0.13073	0.00000	0.00000	0.00000
Curitiba	+	+	+	+	+	+	+	=====	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Belém	-	-	+	+	+	+	+	+	=====	0.30404	0.32883	0.00160	0.00085
Ceara	-	-	-	-	-	-	-	+	-	=====	0.03900	0.00728	0.00166
CIDH	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	=====	0.00000	0.00000
CEDEBA	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	=====	0.00008
Brasília	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	=====

At the bottom, the symbol "+" means significant differences between centers (significance level = 0.05) and with all upper values the correspondent p (bold significant figures).

The main objective of this joint project, which collected samples from patients with DM1, was to get a large number of samples. This strategy was effective because it resulted in 1244 samples; however, as we see in Tables 1 and 2, there are differences in allelic and genotypic frequencies between the different centers from which the samples were collected. This result shows the need for caution in the analysis of such data. It is not wise simply to merge the sample in to one. As, for now, some needed information was not processed, it is not possible to further analyze these differences. To answer these differences, we have two sources of heterogeneity; one is the ethnic composition of the samples, as we have samples from different regions of Brazil, which is known to have different ancestral ethnic compositions such as Negroid, Caucasoid and Amerindian (Pena et al., 2011). The other possible issue is that there may have been differences in relation to how the disease was approached from one center to another. Although the diagnosis and inclusion criteria should be the same between the different centers, as they are different teams and realities, this can lead to heterogeneity in the

group within different centers; if such hypothesis is true, the analyzed polymorphisms may be related to this aspect of DM1 that might be different between the centers.

The Hardy-Weinberg disequilibrium of genotypes of the SNPs in some centers also strengthens their participation in the disease, but also shows the heterogeneity between centers. The SNP rs187238 in the *IL-18* gene is not in equilibrium in the sample of Brasilia and Bahia (Cedeba), in both there is a lack of heterozygotes. On the other hand, the rs1946518 of the same gene in the sample of Rio Grande do Sul and Bahia (Cedeba) is not in Hardy-Weinberg equilibrium for different reasons. While the sample of Rio Grande do Sul there is a loss of heterozygotes with a gain of recessive homozygous, in the case of the Bahia, there is a loss of recessive homozygous. Finally, in the *IL-12B* gene the SNP rs3212227 is not in equilibrium at the Bahia sample (Cedeba), where there is an excess of heterozygotes.

To analyze the similarities among samples, many tests were done to evaluate the possibility of grouping the samples into a single representative sample. Analyzing the median dispersion of each center, a comparison on whether such median follows a pattern, the medians are different. By comparing these medians, it was possible to ascertain some peculiarities, with Curitiba and Bauru being the most similar and Campinas the most different. (Table 3)

Table 3. Comparisons of the median age of diagnosis of DM1 for each center.

	UERJ	Campinas	Bauru	HC-RS	Curitiba	Ceara	CEDEBA	Brasília
UERJ	=====	0.3566	0.01036	0.8416	0.02616	0.2587	0.5285	0.4566
Campinas	+	=====	0.3104	0.4027	0.322	0.941	0.6069	0.6681
Bauru	-	+	=====	0.008448	0.9146	0.2396	0.01777	0,02759
HC-RS	+	+	-	=====	0.02101	0.281	0.307	0.2226
Curitiba	-	+	+	-	=====	0.2725	0.02736	0.0374
Ceara	+	+	+	+	+	=====	0.5318	0.5714
CEDEBA	+	+	-	+	-	+	=====	0.7383
Brasília	+	+	+	+	-	+	+	=====

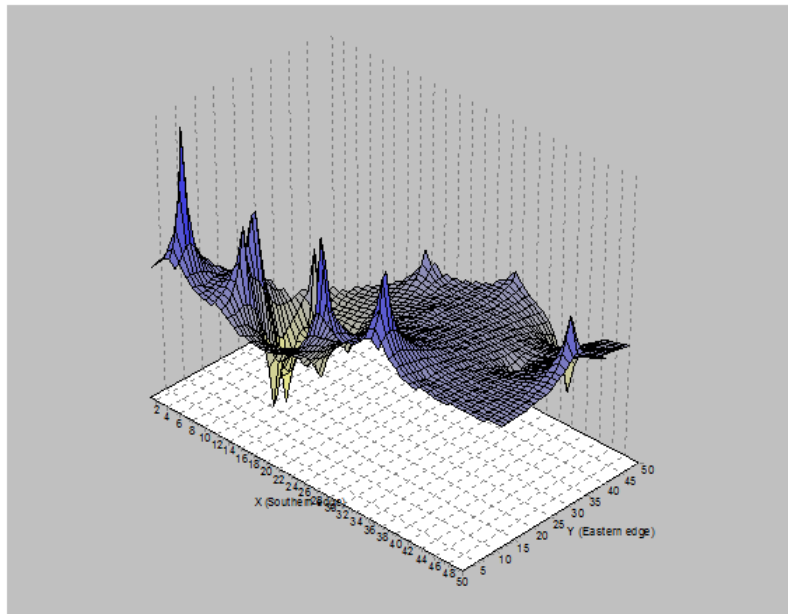
At the bottom, the "+" represents the significant differences between centers.

(different medians; $p > 0.05$) and with all upper values with the correspondent p-values (bold are significant values).

Corroborating the results of dispersion and the allelic and genotypic frequencies with samples not being in Hardy-Weinberg, the data extracted by the differentiation test (Table 2) rendered by the Arlequin program (Excoffier and Lischer, 2010) also highlights the heterogeneity presented by the samples collected in the 13 centers. This whole scenario suggests that the samples cannot be grouped and analyzed as a single sample.

The differences between the centers using the data of all three SNPs (figure 1) can be seen graphically. Where X and Y axes corresponding to the geographical coordinates and the Z axis represents the genetic distances.

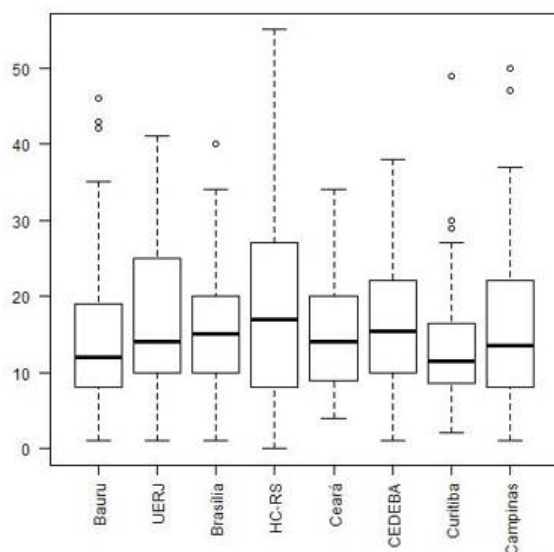
Figure 1. Genetic distances between centers (Z axis), using data from the three SNPs, and the X and Y axes correspond to geographic coordinates.



The "Allele in Space" program (Miller, 2005) was used to analyze the genetic differences between the centers by a visual form. The more similar the samples analyzed, the more plan will be the rendered picture. By using the data of the three SNPs (Figure 1), we can see that the centers further north have demonstrated a greater differentiation compared to centers in southern Brazil.

The data of age at diagnosis of DM1 in each center in Figure 2 and statistical analysis are in Table 3.

Figure 2. Data of the age of diagnostics for DM1 in patients for each center.

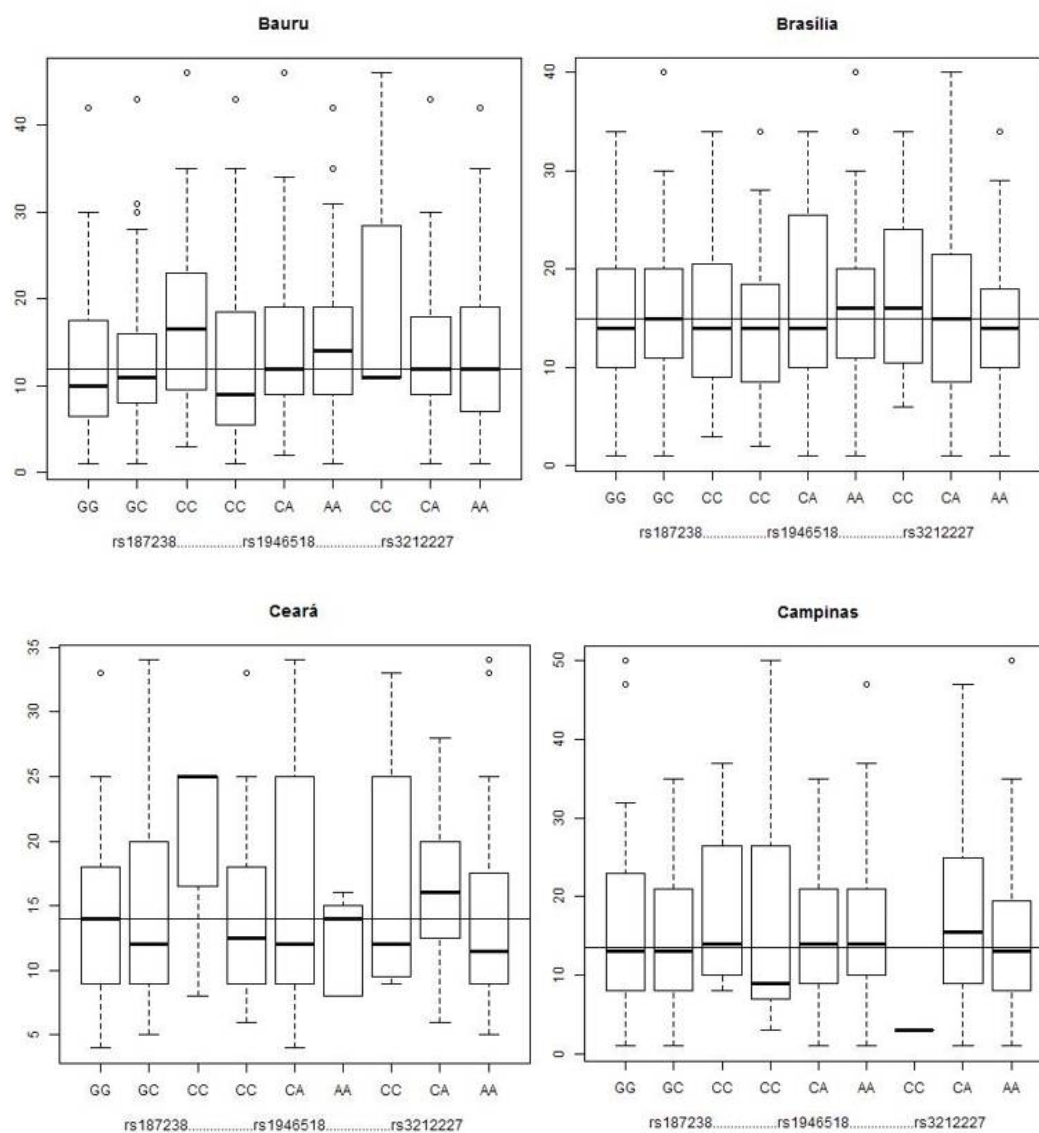


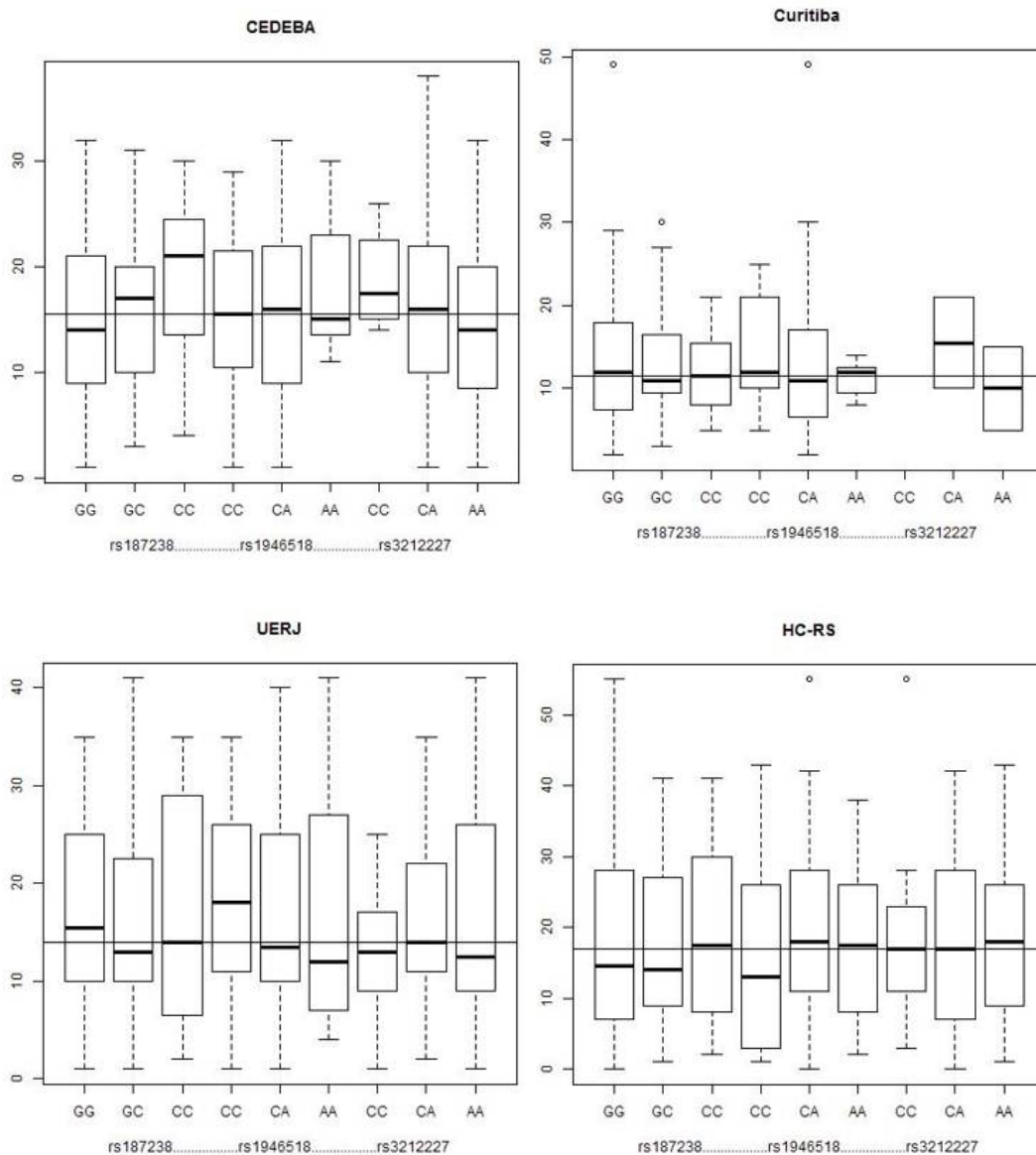
The age at diagnosis of DM1 was then compared with each of the genotypes of the SNP rs187238 and rs1946518 for the *IL-18* gene and rs3212227 for the gene *IL-12B* within each center (figures 3). The horizontal lines represent the median of that particular center. Statistically, by comparison of the medians by Mann Whitney of major against the others (Table 4), there is a significant difference in the center of Bauru by focusing on the genotypes for SNP rs187238 while there is a tendency to significance to the center of HC-RS when focused on SNP rs1946518.

Table 4. Comparison of the median by Mann Whitney test major genotypes against the minor.

Centers	Genotypes	rs187238	rs1946518	rs3212227
		GG e GC vs CC	CA e AA vs CC	CA e AA vs CC
Bauru		W=807, p=0.04955	W=1562.5, p=0.1003	W=125, p=0.4384
UERJ		W=292.5, p=0.8367	W=511, p=0.4703	W=252.5, p=0.4931
Brasília		W=1367, p=0.8515	W=1969.5, p=0.436	W=656, p=0.5533
HC-RS		W=445.5, p=0.5706	W=2564, p=0.05335	W=601, p=0.8721
Ceará		W=36, p=0.4776	W=240.5, p=0.5635	W=108.5, p=0.6356
CEDEBA		W=468, p=0.2164	W=1766, p=0.975	W=172, p=0.3571
Curitiba		W=168, p=0.8244	W=139.5, p=0.5994	

Figures 3. The genotypes of the SNPs rs187238 and rs1946518 of the *IL-18* gene and the rs3212227 of the *IL-12B* gene by center with the age of diagnostic for DM1.



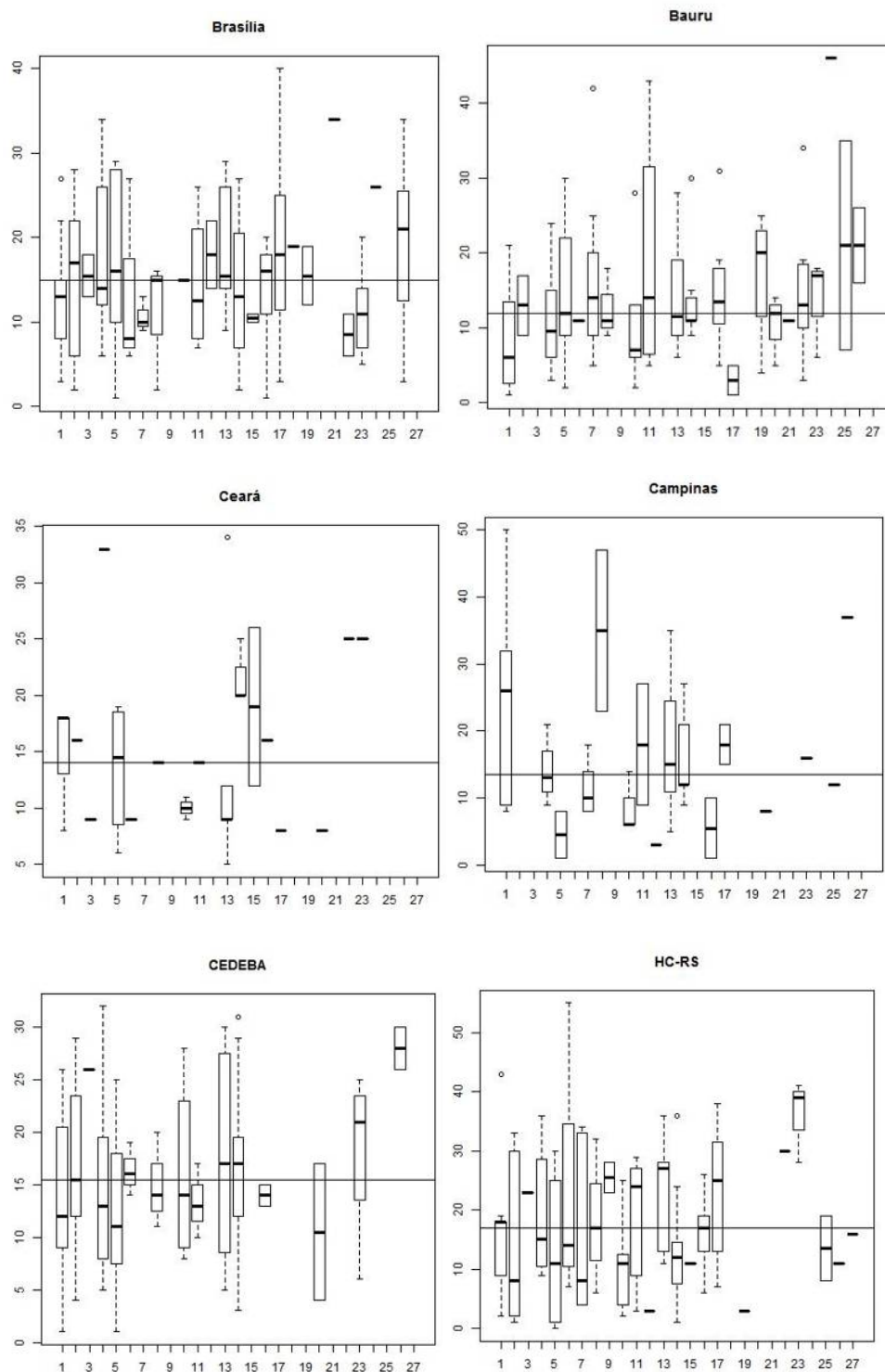


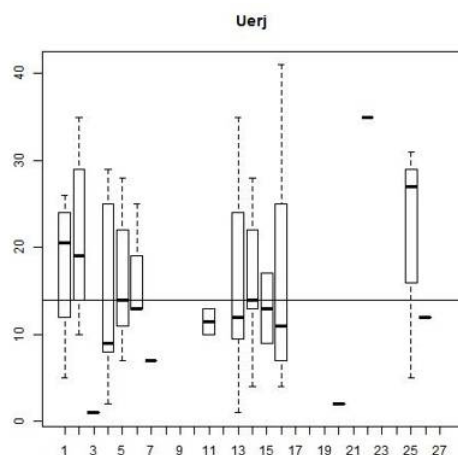
In Table 5 the genotypes are grouped into 27 categories, cited in figures 11 to 17, highlighting those that demonstrate a tendency to present significant difference (in bold) when taking into account the median of age of diagnose.

Table 5. Analysis of genotype groups composed of SNPs rs187238 and rs1946518 of the *IL-18* gene and rs3212227 of the *IL-12B* gene, cited in figures 11 to 17, highlighting those that demonstrate a tendency to significantly differ when observed the median of age of diagnosis.

Groups	Genotypes	Bauru	Brasília	Campinas	Ceará	CEDEBA	HCRS	UERJ
1	GG;CC;AA	AB	ab	AC	AC	AB	ac	AC
2	GG;CC;AC	ac	ac				AB	AC
3	GG;CC;CC		ac					
4	GG;CA;AA	ab	ab	ab		ab	ab	AB
5	GG;CA;AC		ac	AB	ac	AB	AB	
6	GG;CA;CC	ab	AB			ac	ab	ab
7	GG;AA;AA	ac	AB	ab			AB	
8	GG;AA;AC	ab		AC		ab		
9	GG;AA;CC						AC	
10	GC;CC;AA	AB		AB	AB	ab	AB	
11	GC;CC;AC	ac	ab	AC		ab	AC	ab
12	GC;CC;CC		ac					
13	GC;CA;AA	ab	ac	ac	AB	ac	AC	ab
14	GC;CA;AC	ab	ab	ab	AC	ac	AB	
15	GC;CA;CC		AB		AC			ab
16	GC;AA;AA	ac	ac	AB		ab		ab
17	GC;AA;AC	AB	ac	AC			AC	
18	GC;AA;CC							
19	CC;CC;AA	AC	ac					
20	CC;CC;AC					AB		
21	CC;CC;CC	ab						
22	CC;CA;AA	ac	AB					
23	CC;CA;AC	AC	AB			AC	AC	
24	CC;CA;CC							
25	CC;AA;AA	AC					ab	AC
26	CC;AA;AC	AC	AC			AC		
27	CC;AA;CC							

Figures 4 Boxplot comparing the age at diagnosis of DM1 with genotype groups composed of SNPs rs187238 and rs1946518 of the *IL-18* gene and rs3212227 of the *IL-12B* gene in each center.





Comparison of the medians by Mann Whitney test for the genotype groups, using SNPs rs187238 and rs1946518 of the *IL-18* gene, based on a recurring pattern trend among centers are in Table 6.

Table 6. Comparison of Mann Whitney test of the median for genotype groups, using the genotypes of the SNPs rs187238 (GG and GC) and rs1946518 (CC) of the *IL-18* gene against the rest, based on a recurring pattern trend among centers.

Centers	Genotypes
	<u>rs187238 (GG e GC)</u> <u>rs1946518 (CC)</u> <u>vs</u> <u>Other groupings</u>
Bauru	W = 505.5, p = 0.08773
UERJ	W = 104, p = 0.2761
Brasília	W = 958, p = 0.6547
HC-RS	W = 254.5, p = 0.09349
Ceará	W = 7, p = 0.06889
CEDEBA	W = 292, p = 0.06619
Campinas	W = 37, p = 0.2717

When the age of diagnosis is compared with all possible combinations of genotypes (listed in table 5) statistical approached in Table 6, the centers of Bauru, Ceará and Cedeba showed a tendency to be statically significant.

Conclusions

It was not possible to merge the samples from different centers into a single representative sample, due to the difference between them. Some samples not being in equilibrium of Hardy-Weinberg, conveys a possible participation in the disease, the most prominent being the Cedeba center where the three SNPS were statistically significant.

The center of Bauru was significant when analyzed the genotypes for SNP rs187238 while there is a tendency to significance for the center of HC-RS when focused on the SNP rs1946518. While in other centers these results were not repeated.

The grouped genotypes for the analyses of the two SNPs for gene *IL-18* showed a trend to be statically significant only in centers of Bauru, Ceará and Cedeba.

Acknowledgements

Grants and scholarships were received from Coordination for Improvement of Higher Education (CAPES; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), National Research Council (CNPq) and Araucaria Foundation.

References

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabet Med**, v. 15, n. 7, p. 539-53, Jul 1998. ISSN 0742-3071 (Print)0742-3071. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9136\(199807\)15:7<539::aid-dia668>3.0.co](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-9136(199807)15:7<539::aid-dia668>3.0.co) >.

BACH, J. F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. **N Engl J Med**, v. 347, n. 12, p. 911-20, Sep 19 2002. ISSN 0028-4793. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra020100> >.

BAEKESKOV, S. et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. **Nature**, v. 347, n. 6289, p. 151-6, Sep 13 1990. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/347151a0> >.

BRADFIELD, J. P. et al. A genome-wide meta-analysis of six type 1 diabetes cohorts identifies multiple associated loci. **PLoS Genet**, v. 7, n. 9, p. e1002293, Sep 2011. ISSN 1553-7390. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002293> >.

BUCHANAN, T. A. et al. Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. **Am J Obstet Gynecol**, v. 162, n. 4, p. 1008-14, Apr 1990. ISSN 0002-9378 (Print)0002-9378. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers., 1997-10-01 1997. Available at: < <http://cmr.asm.org/content/10/4/742.short> >.

DAVOODI-SEMIROMI, A.; YANG, J. J.; SHE, J. X. IL-12p40 is associated with type 1 diabetes in Caucasian-American families. **Diabetes**, v. 51, n. 7, p. 2334-6, Jul 2002. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 36 Suppl 1, p. S67-74, Jan 2013. ISSN 0149-5992. Available at: < <http://dx.doi.org/10.2337/dc13-S067> >.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. **Eur J Immunol**, v. 37 Suppl 1, p. S34-45, Nov 2007. ISSN 0014-2980 (Print)0014-2980. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200737772> >.

DORNHORST, A. et al. High prevalence of gestational diabetes in women from ethnic minority groups. **Diabet Med**, v. 9, n. 9, p. 820-5, Nov 1992. ISSN 0742-3071 (Print)0742-3071. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

ERLICH, H. et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. **Diabetes**, v. 57, n. 4, p. 1084-92, Apr 2008. ISSN 0012-1797. Available at: < <http://dx.doi.org/10.2337/db07-1331> >.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol Ecol Resour**, v. 10, n. 3, p. 564-7, May 2010. ISSN 1755-098x. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x> >.

GORUS, F. K. et al. IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. The Belgian Diabetes Registry. **Diabetologia**, v. 40, n. 1, p. 95-9, Jan 1997. ISSN 0012-186X (Print)0012-186x. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

HADZIJA, M. P. et al. Polymorphisms in the IL-18 and IL-12B genes and their association with the clinical outcome in Croatian patients with Type 1 diabetes. **Gene**, v. 512, n. 2, p. 477-81, Jan 10 2013. ISSN 0378-1119. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.10.029> >.

HENRY, O. A.; BEISCHER, N. A. Long-term implications of gestational diabetes for the mother. **Baillieres Clin Obstet Gynaecol**, v. 5, n. 2, p. 461-83, Jun 1991. ISSN 0950-3552 (Print)0950-3552. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

HUANG, D.; CANCELLA, M. R.; MORAHAN, G. Complete primary structure, chromosomal localisation, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit. **Genes Immun**, v. 1, n. 8, p. 515-20, Dec 2000. ISSN 1466-4879 (Print)1466-4879. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gene.6363720> >.

HUANG, J. et al. 1000 Genomes-based imputation identifies novel and refined associations for the Wellcome Trust Case Control Consortium phase 1 Data. **Eur J Hum Genet**, v. 20, n. 7, p. 801-5, Jul 2012. ISSN 1018-4813. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2012.3> >.

IBELGAUFTS, H. cytokines (Cytokines & Cells Encyclopedia - COPE). 2015. Available at: < <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=cytokines> >.

JARVELA, I. Y. et al. Gestational diabetes identifies women at risk for permanent type 1 and type 2 diabetes in fertile age: predictive role of autoantibodies. **Diabetes Care**, v. 29, n. 3, p. 607-12, Mar 2006. ISSN 0149-5992 (Print)0149-5992. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

KAUTZKY-WILLER, A. et al. Pronounced insulin resistance and inadequate beta-cell secretion characterize lean gestational diabetes during and after pregnancy. **Diabetes Care**, v. 20, n. 11, p. 1717-23, Nov 1997. ISSN 0149-5992 (Print)0149-5992. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

KIM, C.; NEWTON, K. M.; KNOPP, R. H. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. **Diabetes Care**, v. 25, n. 10, p. 1862-8, Oct 2002. ISSN 0149-5992 (Print)0149-5992. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

KUHL, C. Insulin secretion and insulin resistance in pregnancy and GDM. Implications for diagnosis and management. **Diabetes**, v. 40 Suppl 2, p. 18-24, Dec 1991. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I., JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 19, p. 5444, Oct 11 1991. ISSN 0305-1048 (Print)0305-1048. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

LAWRENCE, J. M. et al. Trends in the prevalence of preexisting diabetes and gestational diabetes mellitus among a racially/ethnically diverse population of pregnant women, 1999-2005. **Diabetes Care**, v. 31, n. 5, p. 899-904, May 2008. ISSN 0149-5992. Available at: < <http://dx.doi.org/10.2337/dc07-2345> >.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117-26, Feb 2000. ISSN 0039-6060 (Print)0039-6060. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1067/msy.2000.101584> >.

MCINNES, I. B. et al. Interleukin 18: a pleiotropic participant in chronic inflammation. **Immunol Today**, v. 21, n. 7, p. 312-5, Jul 2000. ISSN 0167-5699 (Print)0167-5699. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

MILLER, M. P. Alleles in space (AIS): computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. **J Hered**, v. 96, n. 6, p. 722-4, Nov-Dec 2005. ISSN 0022-1503 (Print)0022-1503. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esl119> >.

MORAHAN, G. et al. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. **Nat Genet**, v. 27, n. 2, p. 218-21, Feb 2001. ISSN 1061-4036 (Print)1061-4036. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/84872> >.

NAKAHIRA, M. et al. Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1. **J Immunol**, v. 168, n. 3, p. 1146-53, Feb 1 2002. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

NAKANISHI, K. et al. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 12,

n. 1, p. 53-72, Mar 2001. ISSN 1359-6101 (Print)1359-6101. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. **J Mol Evol**, v. 19, n. 2, p. 153-70, 1983. ISSN 0022-2844 (Print)0022-2844. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

NERUP, J.; POCIOT, F. A genomewide scan for type 1-diabetes susceptibility in Scandinavian families: identification of new loci with evidence of interactions. **Am J Hum Genet**, v. 69, n. 6, p. 1301-13, Dec 2001. ISSN 0002-9297 (Print)0002-9297. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

OKADA, H. et al. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. **Clin Exp Immunol**, v. 160, n. 1, p. 1-9, Apr 2010. ISSN 0009-9104 (Print)1365-2249 (Electronic). Available at: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04139.x> >.

OLIVEIRA, C. M. B. D. et al. Cytokines and pain. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 61, n. 2, p. 260-265, 04/2011 2011. ISSN 0034-7094. Available at: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-70942011000200014&lng=en&nrm=iso&tlng=pt >.Available at: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-70942011000200014&lng=en&nrm=iso&tlng=pt >.Available at: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0034-70942011000200014&lng=en&nrm=iso&tlng=pt >.

PALMER, J. P. et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. **Science**, v. 222, n. 4630, p. 1337-9, Dec 23 1983. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

PENA, S. D. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017063> >.

PLAGNOL, V. et al. Genome-wide association analysis of autoantibody positivity in type 1 diabetes cases. **PLoS Genet**, v. 7, n. 8, p. e1002216, Aug 2011. ISSN 1553-7390. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002216> >.

RABIN, D. U. et al. Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. **J Immunol**, v. 152, n. 6, p. 3183-8, Mar 15 1994. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

ROTHER, H. et al. Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. **J Clin Invest**, v. 99, n. 3, p. 469-74, Feb 1 1997. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci119181> >.

SABBAH, E. et al. Genetic, autoimmune, and clinical characteristics of childhood- and adult-onset type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 23, n. 9, p. 1326-32, Sep 2000. ISSN 0149-5992 (Print)0149-5992. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

SANDHOLM, N. et al. New susceptibility loci associated with kidney disease in type 1 diabetes. **PLoS Genet**, v. 8, n. 9, p. e1002921, Sep 2012. ISSN 1553-7390. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002921> >.

SCHMIDT, M. I. et al. Gestational diabetes mellitus diagnosed with a 2-h 75-g oral glucose tolerance test and adverse pregnancy outcomes. **Diabetes Care**, v. 24, n. 7, p. 1151-5, Jul 2001. ISSN 0149-5992 (Print)0149-5992. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Prevalence of gestational diabetes mellitus--do the new WHO criteria make a difference? Brazilian Gestational Diabetes Study Group. **Diabet Med**, v. 17, n. 5, p. 376-80, May 2000. ISSN 0742-3071 (Print)0742-3071. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

STEPHENS, M.; SCHEET, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. **Am J Hum Genet**, v. 76, n. 3, p. 449-62, Mar 2005. ISSN 0002-9297 (Print)0002-9297. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1086/428594> >.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **Am J Hum Genet**, v. 68, n. 4, p. 978-89, Apr 2001. ISSN 0002-9297 (Print)0002-9297. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1086/319501> >.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ**, v. 299, n. 6710, p. 1259-60, Nov 18 1989. ISSN 0959-8138 (Print)1468-5833 (Electronic). Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

SWAFFORD, A. D. et al. An allele of IKZF1 (Ikaros) conferring susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia protects against type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 60, n. 3, p. 1041-4, Mar 2011. ISSN 0012-1797. Available at: < <http://dx.doi.org/10.2337/db10-0446> >.

TAKEDA, K. et al. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. **Immunity**, v. 8, n. 3, p. 383-90, Mar 1998. ISSN 1074-7613 (Print)1074-7613. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

TAVARES, N. A. et al. Interleukin 18 (IL18) gene promoter polymorphisms are associated with type 1 diabetes mellitus in Brazilian patients. **Cytokine**, v. 62, n. 2, p. 286-9, May 2013. ISSN 1043-4666. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.03.004> >.

TODD, J. A.; BELL, J. I.; MCDEVITT, H. O. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. **Nature**, v. 329, n. 6140, p. 599-604, Oct 15-21 1987. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/329599a0> >.

WINDSOR, L. et al. Alleles of the IL12B 3'UTR associate with late onset of type 1 diabetes. **Hum Immunol**, v. 65, n. 12, p. 1432-6, Dec 2004. ISSN 0198-8859 (Print)0198-8859. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2004.09.001> >.

YANG, J. M. et al. Interleukin-12p40 gene (IL-12B) polymorphism and Type 1 diabetes mellitus in Japanese: possible role in subjects without having high-risk HLA haplotypes. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 71, n. 2, p. 164-9, Feb 2006. ISSN 0168-8227 (Print)0168-8227. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2005.05.005> >.

YOSHIMOTO, T. et al. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. **J Immunol**, v. 161, n. 7, p. 3400-7, Oct 1 1998. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **Int Anesthesiol Clin**, v. 45, n. 2, p. 27-37, Spring 2007. ISSN 0020-5907 (Print)1537-1913 (Electronic). Available at: < <http://dx.doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e> >.

APÊNDICE 2 – LISTA DE COORDENADAS GEOGRÁFICAS DOS CENTROS

Cidade	Latitude	Longitude
Belém (PA)	-1.456519	-48.481982
Fortaleza (CE) – UFC	-3.730739	-38.523264
Fortaleza (CE) – CIDH	-3.730739	-38.523264
Salvador (BA) – CEDEBA	-12.973290	-38.496498
Brasília (DF)	-15.795115	-47.883305
Rio de Janeiro (RJ) – UERJ	-22.906204	-43.202511
Rio de Janeiro (RJ) – UFRJ	-22.906204	-43.202511
São Paulo (SP) – FMUSP	-23.551552	-46.654351
São Paulo (SP) – UNIFESP	-23.551552	-46.654351
Campinas (SP)	-22.910305	-47.063220
Bauru (SP)	-22.315175	-49.061710
Curitiba (PR)	-25.420755	-49.266803
Porto Alegre (RS)	-30.034267	-51.215254

APÊNDICE 3 – DETALHES SOBRE O BOXPLOT

No corpo do Boxplot, as partes inferior e superior delimitam os valores compreendidos entre o 1º quartil e o 3º quartil, respectivamente. O intervalo entre os dois é denominado de Intervalo Interquartil (IQR, que compreende 50% dos dados).

As linhas horizontais menores abaixo representam o percentil de $1^{\circ}Q - 1,5 \times IQR$ ou o valor mínimo da dispersão (o maior deles). Esse valor também compreende $-2,698\sigma$ da dispersão.

As linhas horizontais menores acima representam o percentil de $3^{\circ}Q + 1,5 \times IQR$ ou valor máximo (o menor deles). Como também $2,698\sigma$ da dispersão.

Na região compreendida entre $1^{\circ}Q - 1,5 \times IQR$ e $1^{\circ}Q - 3 \times IQR$ e entre $3^{\circ}Q + 1,5 \times IQR$ e $3^{\circ}Q + 3 \times IQR$ são valores possíveis de outliers (valores discrepantes). Abaixo de $1^{\circ}Q - 3 \times IQR$ e acima de $3^{\circ}Q + 3 \times IQR$ são denominados de outliers.

O traço horizontal mais grosso representa a mediana da dispersão. O acinturamento do corpo do boxplot compreende o intervalo de confiança de 95% da mediana. Sendo possível diferenciar significativamente entre duas medianas que não se sobrepõem nesse “acinturamento”.